

PAPEL DE DISSIALOGLANGLIOSÍDIOS NA PROGRESSÃO TUMORAL DE MELANOMAS

ANA PAULA MARQUES DUARTE

**Tese de doutorado apresentada à
Fundação Antônio Prudente para
obtenção do Grau de Doutor em
Ciências.**

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Prof. Dr. Roger Chammas

**São Paulo
2004**

**EXEMPLAR
ESPECIAL**

**FUNDAÇÃO ANTONIO
PRUDENTE
BIBLIOTECA**

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do Centro de Tratamento e Pesquisa
Hospital do Câncer A.C. Camargo

Duarte, APM.

Papel de dissialogangliosídios na progressão tumoral de melanomas / Ana Paula Marques Duarte. -- São Paulo, 2004.

147p.

Tese(doutorado)—Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências—Área de concentração: Oncologia.

Orientador: Roger Chammas.

Descritores: 1. MELANOMA. 2. GANGLIOSÍDIOS/biossíntese. 3. METÁSTASES. 4. MIGRAÇÃO CELULAR.

“Sem ser por nossa culpa, nem por força de qualquer planejamento cósmico ou propósito consciente, nós nos tornamos, graças a uma maravilhosa obra do acaso chamada inteligência, os administradores da continuidade da vida na terra. Não pedimos para desempenhar esse papel, mas não podemos abjurá-lo. Podemos não ser talhados para ele, mas não há outro jeito.”

Stephen Jay Gould, The Flamingo's Smile

“We wonder, ever wonder why we find us here.”

Thomas Hardy

DEDICATÓRIA

**Aos meus pais, Cleusa e Torricelli,
pelo amor, compreensão e incentivo.**

**À minha avó, Adi,
pelo amor, carinho e
pelos valorosos ensinamentos
que não se aprendem na vida acadêmica.**

AGRADECIMENTOS

À minha família, pelo carinho e apoio incondicional.

Ao Prof. Dr. Roger Chammas, pela orientação e oportunidade de trabalhar em seu grupo de pesquisa; e pelo exemplo como pesquisador, contribuindo muito para meu amadurecimento profissional.

À Profa. Dra. Maria Mitzi Brentani, do Departamento de Radiologia da Disciplina de Oncologia Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela oportunidade de realizar meu trabalho nesta instituição.

Ao Dr Luiz Fernando Lima Reis, diretor da pós-graduação em Ciências da Fundação Antônio Prudente, pela oportunidade de me acolher na pós-graduação e pela força nos momentos de indecisão.

Ao Prof. Dr. Renato A. Mortara, pelo auxílio na realização da microscopia confocal.

Aos colegas do Laboratório de Adesão celular de Câncer: Raphael, Fabiana, Mara, Verônica, Luciana, Andréia e Mônica e a todos do LIM24 que participaram direta ou indiretamente deste trabalho, e que compartilharam comigo as alegrias e dificuldades do dia a dia.

À Heliana Han, pela amizade e auxílio no desenvolvimento inicial deste trabalho.

Aos colegas que não se encontram mais trabalhando aqui, Estevão, Miriam, Patrícia e Marilena pelo companheirismo e amizade.

À Dra. Therezinha e Dra. Shigueko, pela amizade e apoio nos momentos difíceis.

À Cristina Grandal, pelo auxílio na formatação das figuras desta tese.

À Maria José, Wilame, Jair, Claudete e D. Berenice, pelo auxílio indispensável à realização deste trabalho.

À Ana Maria e Márcia, funcionárias da secretaria de pós-graduação, pelo suporte administrativo durante todo o curso, pelas valiosas informações, disponibilidade e carinho.

À Elis e sua Família, por ter me acolhido com tanto carinho em sua casa.

À Edina, pela amizade e conselhos mesmo a distância.

Aos grandes amigos feitos em Sampa: Laura, Jane, Patricia S., Fábio, Dário, Elis, Lara, Silvana, Enrique, Nídia, Aline, Fabiana e Mara pelos divertidos e valiosos "experimentos" fora do laboratório.

Às Valérias da vida, Morcego, Paixão e Vieira, pela amizade e incentivo.

Ao CNPq e Capes, pela bolsa concedida e pelo suporte financeiro.

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Melanócito	1
1.2	Melanoma	4
1.2.1	Perda ou Resistência à Inibição de Proliferação	5
1.2.2	Alterações em Moléculas Importantes no Controle do Ciclo Celular em Melanomas	7
1.2.3	Processos de Evasão a Resposta Apoptótica dos Melanomas	9
1.2.3	Indução Sustentada da Angiogênese, Invasão e Mestátase em Melanomas	10
1.3	Gangliosídios	13
1.4	Biossíntese de Gangliosídios	17
1.4.1	Controle Transcricional da G_{M2}/G_{D2} sintase	23
1.5	Balsas Lipídicas (“Lipids Rafts”)	25
1.5.1	Integrinas e Tetraspaninas	27
1.6	Apoptose e G_{D3}	30
1.7	Modelo de Melanoma Murino para Avaliação da Progressão Tumoral	34

2	OBJETIVOS	36
2.1	Objetivo Geral	36
2.1.1	Objetivos Específicos	36
3	MATERIAL E MÉTODOS	38
3.1	Células e Anticorpos	38
3.2	Ensaio de Sensibilidade a Geneticina	40
3.3	Extração e Purificação dos Plasmídeos	40
3.4	Digestão do Plasmídeo com ECO-RI e HINDIII	42
3.5	Transfecção	43
3.6	Citometria de Fluxo	45
3.7	Inibição da Glucosiltransferase através de PPPP	46
3.8	Ensaio de Adesão	46
3.9	Resposta Migratória Induzida por Laminina (“Transwells”)	47
3.10	Migração Celular (“Scrape Assay”) e Imunofluorescência Indireta	48
3.11	Imunoprecipitação	49
3.12	Extrato Lipídico	50
3.13	Ensaio de ELISA	51
3.14	Morte Celular	52
3.14.1	Tratamento de TM1 com G _{D3} Exógeno e/ouEstaurosporina	52

3.14.2	Iodeto de Propídio	52
3.14.3	JC1	53
3.15	Análise da Expressão das Enzimas G_{D3} sintase E G_{M2}/G_{D2} sintase por RT-PCR	54
3.15.1	Extração de RNA Total	54
3.15.2	Tratamento do RNA com DNase	55
3.15.3	Síntese de cDNA	56
3.15.4	Reação de RT-PCR	56
3.16	Curva de Proliferação dos Transfectantes de TM1	57
3.17	Ensaio de Transplantabilidade dos Transfectantes de TM1 em Camundongos C57/BI-6	58
3.18	Análise do Gene <i>TP53</i> nas Linhagens Celulares Utilizadas	59
3.18.1	Extração de DNA	59
3.18.2	Iniciadores	59
3.18.3	PCR Específica para Seqüenciamento Direto	60
3.18.4	Seqüenciamento Direto	60
4	RESULTADOS	62
4.1	Obtenção dos Transfectantes de melan-a	62
4.2	Avaliação da Distribuição Subcelular de Dissialogangliosídeos	65

4.3	Inibição da Glucosil Ceramida Sintase Utilizando PPPP para os Ensaio de Migração	67
4.4	Avaliação Qualitativa e/ou Quantitativa das Integrinas nas Diferentes Células e Condições de Tratamento	73
4.4.1	Nos Transfectantes de melan-a e Clones	73
4.4.2	Nos Transfectantes de melan-a e seus Clones Tratados ou não com PPPP	73
4.5	Avaliação de Parâmetros Associados à Interação Célula-Matriz Extracelular	77
4.5.1	Adesão	77
4.5.2	Migração	78
4.5.2.1	Migração Estimulada por Laminina	78
4.5.2.2	Efeito da Depleção de Gangliosídios na Migração Celular	78
4.5.2.3	Efeito da Depleção de Colesterol na Resposta Migratória Estimulada por Laminina	81
4.5.2.4	Efeito G_{M3} e G_{D3} Exógeno na Resposta Migratória Estimulada por Laminina nas Células ME-pcDNA3 e ME-ST8D4 quando Depletadas ou não de Gangliosídios	83

4.5.2.5	Avaliação da Presença da Tetraspanina, CD9, em diferentes Linhagens Celulares e sua Distribuição Subcelular em SK-MEL 28 uma Linhagem de Melanona Humano	86
4.6	Obtenção dos Transfectantes de TM1 para G_{D3} sintase	86
4.6.1	Avaliação dos Níveis de G_{M3} e G_{D3} nos Extratos de Lipídios nos Clones Gerados na Transfecção de G_{D3} sintase em TM1	87
4.7	Avaliação de Morte Celular por G_{D3} em TM1	92
4.7.1	Nos Transfectantes Transientes de TM1 para G_{D3} sintase	92
4.7.1.1	Avaliação de Morte Celular Espontânea pelo Ensaio de Iodeto de Propídio	92
4.7.1.2	Avaliação da Morte Celular Induzida por Estaurosporina pelo Ensaio de JC1	93
4.7.2	Avaliação da Morte Celular Induzida por Estaurosporina em TM1 na Presença ou não de G_{D3} Exógeno pelo Ensaio de Iodeto de Propídio	94
4.8	Análise da Expressão, por RT-PCR, da G_{M2}/G_{D2} sintase e G_{D3} sintase nas Células TM1 Transfectadas com o Gene da G_{D3} sintase	95

4.9	Tempo de Duplicação e Tumorigênese <i>In Vivo</i> Semelhante entre as Linhagens TM1.pcDNA e TM1.ST8	98
4.10	Análise do Gene <i>TP53</i> em melan-a, ME-pcDNA3, ME-ST8Sial e TM1	101
5	DISCUSSÃO	103
5.1	Remodelamento do Perfil de Gangliosídios em melan-a através da Transfecção da <i>G_{D3} sintase</i>	103
5.2	Remodelamento do Perfil de Gangliosídios em Transfectantes de TM1 através da Transfecção da <i>G_{D3} sintase</i>	110
5.3	Análise do Gene <i>TP53</i> em melan-a, ME-pcDNA3, ME-ST8Sial e TM1	116
6	CONCLUSÕES	120
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	121

LISTA DE ABREVIATURAS

CDK: Quinase dependente de ciclina

cDNA: DNA complementar

CDX: Metil β -Ciclodextrina

DNA: Ácido desoxiribonucléico

EGF: Fator de crescimento epidermal

FGF: Fator de crescimento de fibroblastos básico

G_{D2}: Sia α 2-8Sia α 2-3[GalNAc β 1-4]Gal β 1-4Glc β 1-Cer

G_{D3}: Sia α 2-8Sia α 2-3Gal β 1-4Glc β 1-Cer

GEM: Microdomínios ricos em GSLs

GSLs: Glicosfingolípídios

HGF/SF: Fator de crescimento de hepatócitos/*scatter factor*

IGF-1: Fator de crescimento insulina-símile-1

IL-2: Interleucina 2

ILK: Quinase ligadora de integrina

JC-1: 5, 5', 6, 6'-tetracloro-1, 1', 3, 3'-tetraetil-bensimidazolilcarbocianino
iodido

MAPK: Proteína quinase ativada por mitógeno

MMP: Metaloproteinase

M-SCF: Fator de crescimento de mastócitos

PDGF: Fator de crescimento derivado de plaquetas

PDMP: d-treo-1-fenil-2-decanoilamino-3-morfolino-1-propanol

PMA: Éster de forbol

PPPP: *d*-1-threo-1-fenil-2-hexadecanoilamono-3-pirrodilino-1-propanol-HCl

pró-uPA: Receptor do ativador de plasminogênio tipo uroquinase

RE-Golgi: Retículo Endoplasmático-Golgi

RNA: Ácido ribonucléico

RT-PCR: Reação em cadeia da polimerase precedida da reação de transcrição reversa

SCLC: Câncer de células pequenas do pulmão

TGF: Fator de crescimento tumoral

UV: Radiação ultravioleta

VEGF: Fator de crescimento endotelial vascular

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Fotomicrografia de corte de pele humana	4
Figura 2	Biossíntese de gangliosídeos	18
Figura 3	Esquema proposto da estrutura supramolecular dos pontos de contato; um exemplo de microdomínio especializado da membrana plasmática	30
Figura 4	Obtenção dos transfectantes de melan-a	63
Figura 5	Expressão dos dissialogangliosídeos nas células transfectadas	64
Figura 6	A distribuição dos dissialogangliosídeos nas células melan-a transfectantes durante o processo de migração celular	69
Figura 7	A distribuição de G_{M3} nas células melan-a transfectantes durante o processo de migração celular: avaliação por microscopia confocal	70
Figura 8	A distribuição dos dissialogangliosídeos nas células melan-a transfectantes durante o processo de migração celular: avaliação por microscopia confocal	71
Figura 9	A distribuição dos dissialogangliosídeos nas células melan-a transfectantes durante o processo de migração celular: avaliação por microscopia confocal	72

Figura 10	β_1 e β_3 integrinas apresentam o mesmo nível de expressão em ambas células (Controle e transfectadas)	74
Figura 11	Não houve diferenças qualitativas quanto à composição das integrinas em ME-pcDNA3 e ME-ST8Sial	75
Figura 12	A depleção de glicosfingolipídios não altera a expressão de integrinas na superfície das células derivadas de melan-a	76
Figura 13	ME-ST8Sial e seus clones aderem mais a elementos de matriz que as células ME-pcDNA3	79
Figura 14	ME-ST8Sial e seus clones migram mais em resposta a laminina que as células ME-pcDNA3	80
Figura 15	Depleção de colesterol da membrana plasmática está associada a um aumento na resposta migratória de células ME-ST8D4	82
Figura 16	Exposição das células a G_{D3} exógeno aumenta a sua resposta migratória	84
Figura 17	A resposta migratória de ME-pcDNA3 e ME-ST8Sial diminui na presença de G_{M3} exógeno	85
Figura 18	Histogramas representando a expressão de CD9 e 9-O-acetil- G_{D3} na superfície dos transfectantes de SK-MEL-28	88
Figura 19	CD9 está presente na membrana da superfície de células SK-MEL-28	89

Figura 20	A expressão de dissialogangliosídios em células transfectadas é perdida ao longo do processo de seleção clonal com o antibiótico G418	90
Figura 21	Ausência de reatividade contra anticorpos anti-dissialogangliosídios em transfectantes TM1.ST8	91
Figura 22	TM1.ST8 parece ser mais sensível à morte induzida por estaurosporina do que TM1.pcDNA	96
Figura 23	Os genes da enzimas G_{D3} sintase são expressos por MEST8D4 e TM1.ST8, mas não pelas linhagens ME-pcDNA3, TM1.pcDNA, TM1 e B16-F10	97
Figura 24	A expressão de G_{D3} sintase e G_{M2}/G_{D2} sintase não interferem na capacidade proliferativa dos transfectantes derivados de TM1	99
Figura 25	A transplantabilidade das células TM1 transfectadas com o gene da G_{D3} sintase ou com o plasmídeo (pcDNA3) vazio foram semelhante	100
Figura 26	Melan-a, ME-pcDNA e ME-ST8Sial, mas não os clones tumorigênico TM1 e TM5, apresentam mutação na região codificadora do gene $TP53$	102

LISTA DE ANEXOS:

ANEXO 1: Elemento responsivo ao fator de transcrição p53 identificado no gene da G_{M2}/G_{D2} sintase.

RESUMO

Duarte APM. **Papel de dissialogangliosídios na progressão tumoral de melanomas**. São Paulo; 2004. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Na progressão tumoral, células de melanoma acumulam derivados de dissialogangliosídios. A função desses glicoconjugados na progressão do tumor ainda é desconhecida. Tem-se estudado um possível papel de dissialogangliosídios na migração celular. A linhagem celular de melanócito, melan-a, foi usada como modelo para a expressão do gene da G_{D3} -sintase (ST8Sia I), a qual é a única enzima conhecida para a conversão de G_{M3} no gangliosídio associado a tumor, G_{D3} . Em transfectantes derivados de melan-a, os dissialogangliosídios modulam a adesão e a migração celular em resposta a laminina-1. Todos os transfectantes mostraram níveis equivalentes de integrinas na superfície celular. Melanócitos G_{M3}^+/G_{D3}^+ tenderam a aderir e migrar mais frente a superfícies revestidas por laminina do que as células G_{M3}^+/G_{D3}^- . Depleção metabólica de glicosíngolipídios, usando-se o inibidor da glucosilceramida sintase, fenil-palmitoilamino-pirrolidino-propanol (PPPP), levou à geração de células (LacCer⁽⁻⁾)/ G_{M3}^-/G_{D3}^- . Essas células também foram mais migratórias do que as células G_{M3}^+/G_{D3}^- , sugerindo que G_{M3} tivesse um papel negativo na migração celular. De fato, a adição de G_{M3} em células derivadas de melan-a inibiu a migração celular; enquanto que a adição de G_{D3} promoveu a migração frente a laminina-1. Juntos, nossos resultados sugerem que a razão entre G_{M3} e G_{D3} em melanócitos modula a motilidade celular

dependente de integrina. Nós também mostramos o papel pró-apoptótico de G_{D3} em células de melanoma murino (TM1). Neste sistema, o insucesso na expressão estável de G_{D3} em TM1 foi acompanhado da expressão *de novo* de G_{M2}/G_{D2} sintase, o que levaria a um possível remodelamento de G_{D3} para gangliosídios mais complexos. Uma pressão seletiva para esta expressão poderia ser a sensibilização de células G_{D3} positivas à morte celular. As células sobreviventes seriam aquelas que adquiriram a capacidade de modificar o seu produto da G_{D3} sintase para um dos seus derivados, não-apoptogênicos.

SUMMARY

Duarte APM. **Role of Disialoganglioside in Melanoma Tumor Progression.** São Paulo; 2004. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Upon tumor progression, melanoma cells accumulate disialoganglioside derivatives. The function of these molecules in tumor progression remains unknown. To address possible functions of the disialoganglioside G_{D3} , the murine melanocyte cell line, melan-a, was transfected with the G_{D3} *synthase* gene (ST8Sia I). In melan-a transfectants, disialogangliosides modulated melanocyte cell adhesion and migration. All transfectants displayed equivalent levels of integrins on the cell surface. G_{M3}^+/G_{D3}^+ melanocytes tended to adhere and migrate more towards laminin-1 coated surfaces than G_{M3}^+/G_{D3}^- cells. Depletion of glycosphingolipids, using phenyl-palmitoylamino-pirrolidino-propanol (PPPP), rendered cells (LacCer⁻)/ G_{M3}^-/G_{D3}^- . These latter cells were also more migratory than G_{M3}^+/G_{D3}^- cells, suggesting that G_{M3} plays a negative role in cell migration. We next examined the effect of exogenously added gangliosides. Addition of G_{M3} to melan-a cells also inhibited cell migration; whereas exogenously added G_{D3} promoted it. Taken together, our results suggest that the ratio between G_{M3} and G_{D3} in melanocytes modulates migration. We have also uncovered a pro-apoptogenic function of G_{D3} in murine melanomas, as we failed to achieve stable expression of G_{D3} in melanoma cells due to their increased sensitivity to cell death inducing agents. Failure of maintaining high expression of G_{D3} in murine melanoma cells was

associated with *de novo* expression of G_{M2}/G_{D2} synthase gene. This gene converts G_{D3} in G_{D2} . G_{M2}/G_{D2} synthase gene expression could warrant survival of G_{D3} synthase expressing cells, by consuming G_{D3} and therefore releasing cells from the pro-apoptogenic effect of this ganglioside.

1. INTRODUÇÃO

1.1.MELANÓCITOS

Os melanócitos são células pigmentadas localizadas na camada basal da epiderme, infundíbulo e na região bulbar dos folículos pilosos, na coróide e nas leptomeninges. Os melanócitos têm origem neuroectodérmica e são responsáveis pela produção do pigmento melanina. Em humanos, os melanoblastos, células precursoras dos melanócitos, migram da crista neural para a pele entre a 12^a e a 14^a semanas da embriogênese. Na derme, os melanoblastos embrionários sofrem o processo de maturação e/ou diferenciação originando as células precursoras de melanócitos (melanócitos precoces e intermediários), que na epiderme diferenciam-se em melanócitos cutâneos. O melanócito maduro expressa a enzima tirosinase que catalisa a produção do pigmento melanina. O grau de diferenciação dos melanócitos pode ser definido pela sua capacidade de síntese completa e transferência da melanina para os queratinócitos da pele. Um melanócito maduro interage diretamente com aproximadamente 35 queratinócitos (células mais abundantes da epiderme) através da suas expansões citoplasmáticas. Através destas expansões, os melanócitos transferem para o citoplasma dos queratinócitos, os melanosomos, que são organelas contendo melanina caracterizando o processo de pigmentação da pele que pode ser estimulado, por exemplo, por radiação ultravioleta (UV) ^{5,53}.

Os queratinócitos proliferativos, como os melanócitos cutâneos normais, estão localizados na camada basal da epiderme, assentando-se sobre a membrana basal, tipo especializado de matriz extracelular. À medida que ocorre a sua diferenciação, os queratinócitos passam a localizar-se em camadas mais superficiais da epiderme. Os melanócitos normais, ao contrário, estão sempre localizados na camada basal da epiderme. A interação entre estes dois tipos celulares define o "status" proliferativo dos melanócitos^{33,34}. Agentes promotores da carcinogênese como exposição química, bronzamento (UV-A e UV-B), infecções entre outros agentes causam hiperplasia reativa, que por sua vez, pode resultar em uma ruptura das interações célula-célula entre os queratinócitos e melanócitos ativando a proliferação destes últimos.

Embora a base molecular deste controle local da proliferação de melanócitos não esteja completamente esclarecida, parece haver o envolvimento de duas famílias de moléculas localizadas na membrana plasmática de ambos os tipos celulares: caderinas e conexinas. Além da proliferação, a interação célula-célula mediada por estas duas moléculas desempenha um importante papel no controle de outros eventos celulares como a diferenciação, apoptose e migração. A expressão alterada destas moléculas parece ser importante no processo neoplásico. As junções do tipo nexo (compostas por conexinas) estão reduzidas em muitos tipos de tumores⁷⁰. Entretanto pouco se sabe sobre o envolvimento de conexinas no desenvolvimento de melanomas.

Caderinas são uma família de glicoproteínas de membrana que promovem a adesão célula-célula dependente de cálcio. Elas são encontradas nas junções aderentes, domínios especializados da membrana plasmática. Existem as formas clássicas de caderina como E-, N-, e P-caderina e as caderinas atípicas como VE-caderina. As caderinas são expressas de forma diferenciada nos diferentes tipos celulares, tecidos e estágios do desenvolvimento. Por exemplo, E caderina é o principal tipo encontrado em células polarizadas da epiderme, enquanto N-caderinas são expressas em neurônios, miócitos e fibroblastos. O rompimento da adesão mediada por E-caderina facilita a invasão tumoral enquanto o restabelecimento de sua expressão resulta no retardamento do crescimento e inibição da invasão de carcinomas. E-caderina é o principal mediador de adesão entre melanócitos cutâneos e queratinócitos. Esta interação é homofílica, ou seja, uma molécula de E-caderina interage com outra molécula de E-caderina em células apostas ^{1,53}.

Alterações na expressão de moléculas que participam em eventos celulares como adesão podem representar vantagens seletivas ao sucesso das células neoplásicas. Assim, a identificação de elementos que participam dos processos de progressão tumoral será útil para elaboração de testes diagnósticos e poderia trazer subsídios para novas abordagens terapêuticas.

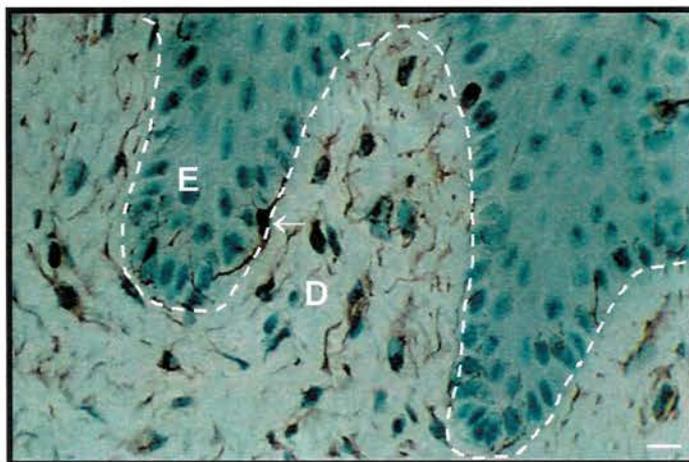


Figura 1: Fotomicrografia de corte de pele humana, identificando a epiderme (**E**) e a derme (**D**), a linha tracejada indica a zona da membrana basal, tipo especializado de matriz extracelular. Na epiderme, os queratinócitos são as células predominantes; observam-se os núcleos dos queratinócitos nas diferentes camadas da epiderme. A camada basal é aquela que está em contato direto com a membrana basal. A seta evidencia um melanócito (completamente corado devido a reação imunoquímica com anticorpos específicos), cujo aspecto é dendrítico (barra, 10 μm)¹⁸

1.2.MELANOMA

Melanomas são tumores originados de melanócitos. Sua incidência vem continuamente aumentando nas últimas décadas, apresentando-se como um problema de saúde pública em diversos países⁵². O melanoma é um tumor de alta morbidade. Este fato se deve principalmente pelo diagnóstico tardio destes tumores, além de sua alta capacidade metastática. CLARK et al.³⁴ propuseram um modelo, classicamente aceito, para a progressão de melanomas:

1. melanócitos de lesões névicas, originados direta ou indiretamente de melanócitos imaturos, poderiam se converter progressivamente em

melanócitos de nevos displásticos, melanomas de crescimento radial (invasivo *in situ*), melanomas de crescimento vertical e finalmente em melanomas metastáticos;

2. alternativamente, como em todos os modelos de progressão, melanócitos imaturos poderiam originar *ab initio* qualquer uma das formas tumorais propriamente ditas.

A tumorigênese é um processo de múltiplos passos com eventos genéticos e epigenéticos que determinam a transição da célula normal para a maligna. HANAHAN e WEINBERG ⁴⁶, em uma sistematização dos achados sobre o processo de transformação maligna, postularam que as alterações genéticas e/ ou epigenéticas levariam a aquisição de 6 principais características da célula cancerosa. Elas seriam: (1) auto-suficiência nas vias de proliferação celular; (2) resistência a sinais de bloqueio das vias de proliferação celular; (3) evasão da resposta apoptótica; (4) potencial ilimitado de replicação; (5) indução sustentada de angiogênese (6) invasão tecidual e metástases. A seguir analisaremos a progressão de melanomas em função das características propostas por HANAHAN e WEINBERG⁴⁶.

1.2.1. Perda ou Resistência à Inibição de Proliferação

Inicialmente moléculas que participam das interações célula-célula e célula-matriz representam um grande número destas vantagens adquiridas pelo tumor durante a tumorigênese. A perda da expressão de E-caderina pelos melanomas é acompanhada por um progressivo aumento na expressão de N-caderina, expressa normalmente, por exemplo, em

fibroblastos dérmicos e células endoteliais ^{1,53}. Estes eventos parecem estar associados ao escape do controle negativo da proliferação dos melanócitos exercido localmente por queratinócitos e parece ser um passo crítico no desenvolvimento de melanomas ¹.

Em algumas condições fisiológicas, fatores produzidos por queratinócitos e fibroblastos dérmicos induzem a proliferação ou sobrevivência sustentada de melanócitos. Entre os principais fatores mitogênicos para melanócitos estão os fatores de crescimento como FGF-2 (fator de crescimento de fibroblastos básico); HGF/SF (fator de crescimento de hepatócitos/scatter factor); endotelinas e o fator de crescimento de mastócitos (também conhecido como o ligante de c-kit ou M-SCF). Estes fatores são produzidos por queratinócitos (FGF-2, endotelinas e M-SCF) e por fibroblastos (FGF-2, HGF/SF e M-SCF), tendo sua síntese estimulada por radiação ultravioleta (UV-B, por exemplo) ^{80,136}. As células de melanoma são capazes de expressar alguns destes fatores de crescimento e seus receptores de forma independente, como o FGF-2 ou HGF/SF, constituindo “loops” autócrinos de sustentação da proliferação celular. O FGF-2 parece ser importante em toda progressão dos melanomas, já sendo observado sua presença em nevos comuns, displásticos e melanoma de crescimento radial. Esta alteração somente não parece determinar a aquisição de um fenótipo de crescimento autônomo destas lesões. As células do melanoma de crescimento vertical passam a superexpressar tanto FGF-2 como TGF- α , que estimulam automaticamente a proliferação destas células. A importância do FGF-2 na proliferação dos melanomas de crescimento vertical também foi

observada pela inibição com oligonucleotídeos contra o FGF-2 ou seus receptores¹⁰⁶.

1.2.2. Alterações em Moléculas Importantes no Controle do Ciclo Celular em Melanomas

Elementos reguladores do ciclo celular estão alterados durante a progressão tumoral do melanoma. Entre estes genes destacam-se genes cujos *loci* encontram-se no cromossomo 9 (9p21). São eles os genes *CDKN2A* e *CDKN2B* que codificam respectivamente as proteínas p16^{INK4a} e p15^{INK4b}. O gene *CDKN2A* além de codificar p16^{INK4a} codifica p19^{ARF}, que é originário de uma fase alternativa de leitura do mesmo gene que codifica p16^{INK4a}. O gene *CDKN2A* está inativado na grande maioria dos melanomas humanos. p16^{INK4a} é o inibidor de CDK4 e CDK6 (ciclina dependente de quinase 4 e 6). Estas quinases juntamente com ciclinas, por exemplo, ciclina D1, são responsáveis pela fosforilação de proteínas da família de Rb. Rb hipofosforilado mantém-se associado ao fator de transcrição E₂F, o que leva à inativação deste fator. A progressiva fosforilação de Rb libera ativação funcional de E₂F promovendo a transição entre as fases G₁ e S do ciclo celular. Mutações germinativas nos genes p16^{INK4A} e ARF que levam à perda de função, ou em CDK4 que levam o ganho de função determinam a susceptibilidade ao melanoma familiar^{33, 35}. A proteína p19^{ARF} atua na via de outro gene supressor, *TP53*. Uma das funções de p53 é induzir a transcrição do inibidor universal das CDKs, p21. A função normal de p53 é controlada por MDM2, uma proteína que leva à degradação de p53; esta função de

MDM2, por sua vez é inibida por p19^{ARF}. Na presença de p19^{ARF}, a vida média de p53 normal é maior, este fato poderia estar associado à estabilidade genômica de células expostas a agentes que lesam o DNA (agentes genotóxicos). Assim, a susceptibilidade de células deficientes em p19^{ARF} ao acúmulo de mutações seria maior do que a de células normais¹¹⁹. Em melanócitos normais senescentes os níveis de p53 e p21 não se apresentam elevados, mas sim os níveis de p16^{INK4A}. Entretanto, melanócitos senescentes deficientes em p16^{INK4A} apresentam alta expressão de p53 e p21. Alterações nestas moléculas podem determinar a perda do controle do ciclo celular, dando a estas células a independência proliferativa necessária para a progressão tumoral^{5,119}.

Em melanoma ocorre também a ativação de proto-oncogenes como BRAF e RAS. BRAF, uma serina-treonina quinase da via RAS, apresenta-se mutada em 60% a 70% dos melanomas, sendo rara a sua alteração em melanomas que não sejam relacionados (radiação UV)³⁵. Mutações em RAS e BRAF quinase ativam a via de MAPK quinase (proteína quinase ativada por mitôgeno) em melanomas. Esta via pode ser ativada também pelo estímulo endógeno de fatores de crescimento como FGF-2 e o fator de crescimento de hepatócitos; além do estímulo exógeno do fator de crescimento insulina-símile-1 (*IGF-1*). Mutações em BRAF não são suficientes para ocorra à transformação neoplásica em melanócitos, visto que nevos normais já apresentam mutações neste gene. Alterações em RAS são observadas em alguns tipos de nevos^{5,15}. Em modelo de melanoma murino onde há a deleção do gene *CDKN2A* ocorre a ativação de RAS. Esta

cooperação é confirmada em outro trabalho onde a perda da função de p19^{ARF} juntamente com ativação de H-Ras e a exposição à luz UV resultam na aceleração da gênese do melanoma ⁵⁷.

1.2.3. Processos de Evasão a Resposta Apoptótica dos Melanomas

Outro ponto chave do fenótipo neoplásico é a evasão da apoptose, e uma das principais proteínas envolvidas no controle da proliferação e morte celular é, novamente, p53. A ativação da proteína p53 pode ser gerada por vários estímulos como hipóxia, lesões genotóxicas, rompimento do fuso mitótico ou superexpressão de oncogene. Mutações no gene *TP53* são raras em melanomas, ¹²⁹ embora sua função esteja comprometida nos casos em que há silenciamento do *locus* *CDKN2A/p19^{ARF}*. Entretanto, melanomas metastáticos freqüentemente apresentam perda de APAF-1 (efetor de morte celular) que faz parte do apoptosomo, o qual é ativado pela liberação de citocromo *c*, e que leva à ativação de caspase 9 na via de apoptose dependente de p53. Estes tumores defectivos para APAF-1 apresentam resistência à quimioterapia e uma incapacidade de executar a programação apoptótica em resposta à ativação de p53 ^{27,114}. A proteína anti-apoptótica BCL-2, que bloqueia a liberação do citocromo *c* pela mitocôndria, tem a expressão aumentada durante a progressão tumoral do melanoma ⁶⁹.

Outra via de sobrevivência alterada nos melanomas é a PI3K/AKT/PTEN. Em melanomas, observa-se freqüentemente a ativação constitutiva de AKT ¹¹⁶. A ativação desta via em melanomas pode ocorrer por alterações em outros genes. Em melanomas o gene ILK (integrin-linked

kinase) apresenta uma expressão aumentada principalmente em estádios mais avançados (com metástases linfonodais) ⁵⁷. A inativação do gene PTEN, um supressor de tumor, ocorre em 30-60% dos melanomas. Como PTEN é um regulador negativo desta via, a sua perda favorece a ativação de AKT diminuindo a apoptose e aumentando a sinalização intracelular de proliferação. RAS além de ativar a via de MAPK quinase, pode ativar também a via PI3K/AKT/PTEN. Estes conjuntos de alterações constituem vantagens seletivas para a célula de melanoma, tanto vantagens proliferativas como de sobrevivência ¹¹⁶.

1.2.4. Indução Sustentada da Angiogênese, Invasão e Metástase em Melanomas

A transição entre o melanoma de crescimento radial para melanomas de crescimento vertical depende da invasão da derme, com perda de integridade da membrana basal; da capacidade proliferativa destas células em seu novo ambiente e da expansão da massa tumoral envolvendo a formação de novos vasos. Este aumento do número de células neoplásicas torna necessário um aumento do aporte de oxigênio e nutrientes para a região da massa tumoral. Fatores como VEGF e PDGF α passam a ser expressos e secretados em melanomas, atuando de maneira parácrina no microambiente, agindo sobre fibroblastos e células endoteliais ⁶⁶. Além desses, a expressão de FGF-2 também está associada ao recrutamento e migração de células endoteliais, ponto importante na angiogênese e conseqüentemente na metástase.

A capacidade de invasão tecidual depende da atividade migratória da célula invasora, que alguns têm sugerido como disfuncional em melanoma. Entretanto, o sucesso da invasão depende: (1) da capacidade da célula tumoral migrar pela matriz; (2) invadir; e (3) sobreviver em outros sistemas. A molécula aparentemente relacionada à aquisição destas capacidades é uma integrina, identificada, como o receptor de vitronectina, $\alpha_v\beta_3$. De maneira independente, a expressão da integrina $\alpha_v\beta_3$ é um dos principais fatores preditivos de prognóstico, estando associado ao caráter localmente invasivo de melanomas ⁸⁷. A expressão de $\alpha_v\beta_3$ em melanomas está associada a disseminação de metástase e a neovascularização tumoral ⁶³. Além de $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_4\beta_1$ e $\alpha_5\beta_1$ estão aumentadas em melanomas. Entretanto $\alpha_6\beta_1$ e $\alpha_6\beta_4$, receptores de laminina, apresentam níveis reduzidos na fases tardias da progressão dos melanomas. As integrinas $\alpha_5\beta_1$ e $\alpha_v\beta_3$ parecem regular positivamente a expressão de Bcl-2 ⁷⁹. Além de mediar a migração, as integrinas funcionam como um co-receptor do receptor do ativador de plasminogênio (pró-uPA) tipo uroquinase. Há evidências da formação de complexos ternários entre o receptor do ativador de plasminogênio, o pró-ativador de plasminogênio e a integrina. Neste complexo, parece haver a ativação de pró-uPA em uPA, que atua como serino-protease, convertendo plasminogênio em plasmina, que por sua vez ativa as pró-metaloproteinases em metaloproteinases (MMPs). Assim, a matriz extracelular vai sendo remodelada e permite a invasão progressiva das células de melanoma. Diversas MMPs apresentam sua expressão alterada em melanomas. MMP-2 está associada ao fenótipo invasivo de melanomas *in vitro*;

interessantemente MMP-2 é ativada principalmente em matriz de colágeno I. Em modelos de progressão tumoral de melanoma murino há a correlação do aumento da expressão de MMP-2 e do fenótipo metastático. A expressão de MMP-2 parece ser modulada pela ligação $\alpha_v\beta_3$ e MMP-2, visto que a ruptura desta ligação por um composto orgânico (TSRI265) reduz o crescimento tumoral e a angiogênese *in vivo*¹¹¹. Outras metaloproteases, como: MMP-1, MT1-MMP, MMP-9 e MMP13 também se encontram alteradas em melanomas⁸⁸.

O envolvimento das moléculas citadas acima na fisiopatologia do melanoma é claro. Contudo, a não ser no caso da integrina $\alpha_v\beta_3$, o estudo sistemático da expressão destas moléculas não nos permite ainda atribuir-lhes qualquer valor clínico (diagnóstico ou prognóstico). A noção que tem se consolidado, é que as alterações funcionais não são necessariamente acompanhadas por alterações quantitativas destes “marcadores” de invasão e/ou migração celular. De outro lado, há um número crescente de evidências que estas moléculas se organizam como verdadeiros complexos supramoleculares na membrana plasmática das células. Por exemplo, no caso das integrinas, fica clara a necessidade de uma estrutura dinâmica que permite a aproximação de várias moléculas (formação de agregados) para que as funções de adesão e migração sejam exercidas eficientemente.

As integrinas interagem com moléculas como tetraspaninas (ver abaixo), que regulam a sinalização mediada por integrinas⁸. Além disto, é necessário lembrar que estas moléculas estão embebidas em uma membrana plasmática que apresenta uma complexa composição de

fosfolipídios e glicoesfingolipídios. Entre os glicoesfingolipídios, encontramos a família dos gangliosídios, que foram caracterizados como “marcadores” associados a melanomas.

1.3.GANGLIOSÍDIOS

Gangliosídios são glicoesfingolipídios contendo pelo menos um resíduo de ácido siálico. Gangliosídios estão principalmente localizados no folheto extracelular das membranas plasmáticas de células de vertebrados. Gangliosídios são geralmente derivados de lactosil-ceramida (Gal β 1-4G1c β 1-Cer) a qual se adicionam (ou não) açúcares neutros e pelo menos um resíduo ácido: o ácido siálico. Ácidos siálicos pertencem a uma família de açúcares (monossacarídios) aniônicos, derivados da condensação de ácido pirúvico e N-acetil-manosamina. Estes açúcares são encontrados na posição terminal das cadeias de glicoproteínas e glicolipídios, sendo responsáveis em parte pelo caráter eletronegativo da superfície de células de mamíferos. Ácidos siálicos podem estar envolvidos na inibição de interações moleculares, por efeito eletrostático, por exemplo, bloqueando adesão celular; ou, ainda serem receptores específicos de lectinas animais (selectinas ou sialoadesinas) ou adesinas, mediando assim interações celulares ^{100,123}.

O gangliosídio freqüentemente encontrado na superfície de células de mamíferos é o monossialogangliosídio G_{M3} (de acordo com a nomenclatura dada por SVENNERHOLM ¹¹⁸). Porém, ao longo da progressão tumoral,

gangliosídios mais complexos são encontrados, como os dissialogangliosídios G_{D3} ($\text{Sia}\alpha 2-8\text{Sia}\alpha 2-3\text{Gal}\beta 1-4\text{Glc}\beta 1-\text{Cer}$) e G_{D2} ($\text{Sia}\alpha 2-8\text{Sia}\alpha 2-3[\text{GalNAc}\beta 1-4]\text{Gal}\beta 1-4\text{Glc}\beta 1-\text{Cer}$), sendo estes considerados marcadores associados a tumores para vários tipos de neoplasias da crista neural, como por exemplo, melanomas. Estes marcadores associados a tumores são expressos de maneira alterada, ora apresentando maiores níveis ora sofrendo alterações de acetilação. Assim, estes dissialogangliosídios podem ser modificados apresentando substituições nos resíduos de ácido siálico, como por exemplo 9-O-acetil- G_{D3} ou de-N-acetil- G_{D3} ^{14,19}. O gangliosídio 9-O-acetil- G_{D3} é uma modificação natural que ocorre com G_{D3} ^{24,50}. Este gangliosídio encontra-se também envolvido em processos de diferenciação e proliferação celular. Observou-se que células de melanoma de hamster que expressam G_{M3} apresentam crescimento lento e são melanomas melanocíticos altamente diferenciados enquanto que células que expressam G_{D3} e O-acetil- G_{D3} possuem um crescimento rápido, e são melanomas indiferenciados e amelanóticos¹¹. A linhagem celular GM-95, derivada do melanoma murino B-16, é deficiente em glicoesfingolípídios. Foram observadas nesta linhagem celular alterações na capacidade de espalhamento celular e no tempo de duplicação⁵⁴. G_{D2} está expresso em células de tumores de células pequenas do pulmão (SCLC) e este gangliosídio, como nos melanomas, está associado à invasão e proliferação. Além disto, o anticorpo anti- G_{D2} induz a apoptose nestas células^{131,132}.

Antes da clonagem da G_{D3} -sintase, diferentes abordagens para se estabelecer o papel biológico de gangliosídios foram testadas. De maneira

geral, estes experimentos foram feitos adicionando-se gangliosídios exógenos ao meio de cultura de diferentes tipos celulares ^{47,98}. Conjuntamente estes estudos sugerem algumas funções biológicas relevantes para estas moléculas:

1. estudos de distribuição de gangliosídios sintetizados endogenamente (como o G_{D3} e G_{D2} , em linhagens de melanomas humanos) demonstraram que estes se localizam preferencialmente nas placas de adesão, microdomínios especializados da membrana plasmática ⁴⁴. O papel de gangliosídios na estabilidade ou função de proteínas presentes na placa de adesão (por exemplo, integrinas) ainda não está esclarecido. Desta forma poderiam estar modulando a adesão e motilidade celular favorecendo a metástase tumoral;
2. alguns trabalhos sugerem que gangliosídios, na presença de fatores de crescimento como EGF e PDGF ^{71,85}, poderiam modular a resposta de alguns tipos celulares a estes fatores de crescimento. Sugere-se que estes gangliosídios modulem a atividade quinase destes receptores de fatores de crescimento. O mecanismo deste fenômeno ainda não está esclarecido. Não se sabe ainda ao certo se este fenômeno depende de uma interação específica entre gangliosídios e receptores para fatores de crescimento ou se este é dependente das características físicas de membranas ricas em gangliosídios. Especialmente em relação ao receptor de EGF parece haver uma interação direta de G_{M3} com este receptor ¹²⁶.

3. G_{M3} e G_{D3} distribuem-se em microdomínios da membrana plasmática, co-localizando com quinases como c-Src, Rho A e Lyn ^{58,65,72}, sugerindo um papel destes gangliosídios como moduladores de quinases que não só as associadas a fatores de crescimento;
4. LLOYD et al. ⁸⁵ avaliaram o potencial tumorigênico de sublinhagens celulares deficientes em G_{D3} , derivadas de uma linhagem celular rica em G_{D3} . Nestes estudos, foi demonstrado que aquelas células são menos tumorigênicas que as células parentais. A relação entre a expressão de G_{D3} e atividade de quinases associadas a proliferação celular neste modelo não foi determinada.

BIRKLÉ et al. ¹² em uma revisão recente sugerem funções biológicas para os gangliosídios na progressão tumoral como as relacionadas acima.

Incluindo ainda:

1. gangliosídios podem atuar como imunossupressores, como observado em células T citotóxicas e células dendríticas;
2. alguns gangliosídios, como G_{D3} ou G_{D2} , promovem angiogênese associada ao tumor ^{67,133}.

Além de marcador tumoral, G_{D3} também é um marcador de atividade linfocitária. Como mencionado acima, há uma correlação positiva entre a expressão de G_{D3} e proliferação celular. De maneira análoga, por muito tempo assumiu-se que a expressão de G_{D3} estaria associada ao estado de proliferação celular de linfócitos ativados ^{97,115}. Nesta última década, os disialogangliosídios como, G_{D3} e G_{D1} , vêm sendo associados ao processo de morte celular em alguns tipos celulares. Este tópico é de suma importância

na compreensão do papel deste gangliosídios na progressão tumoral, e será abordado adiante.

1.4.BIOSSÍNTESE DE GANGLIOSÍDIOS

A biossíntese *de novo* dos glicoesfingolipídios ocorre no lado interno da membrana do retículo endoplasmático-Golgi. Ceramidas são sintetizadas a partir da acilação e desaturação de *d*-eritro-esfinganina. A ceramida sofre glucosilação ou galactosilação pelas respectivas transferases formando assim a glucosilceramida e a galactosilceramida. A glucosilceramida é a precursora da maioria dos gangliosídios. A ceramida é galactosilada originando a lactosilceramida. A partir da lactosilceramida ocorre a biossíntese dos gangliosídios como ilustrado na Figura 2.

A adição de um resíduo de ácido siálico a lactosilceramida origina o primeiro gangliosídio, G_{M3} . Duas diferentes enzimas utilizam G_{M3} como substrato e origina outros gangliosídios: G_{D3} sintase converte G_{M3} em G_{D3} , a G_{M2}/G_{D2} sintase transfere um resíduo de galactose para G_{M3} convertendo-o em G_{M2} (Figura 2).

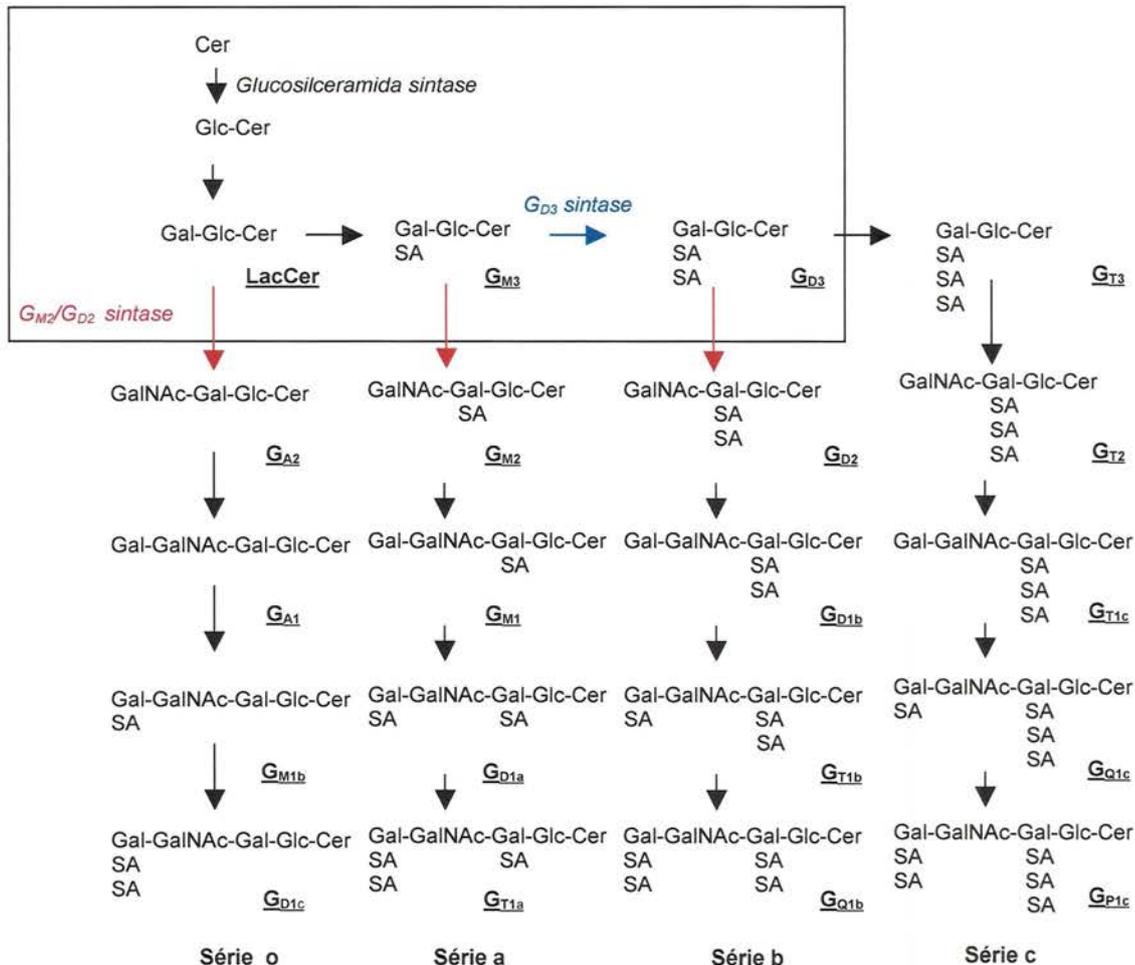


Figura 2: Biossíntese dos gangliosídeos (série ganglio da síntese dos glicoesfingolípídios): SA, ácido N-acetilneuramínico; Gal, galctose; Glc, glicose; GalNAc, N-acetigalactosamina; Cer, ceramida. No quadro em destaque, os gangliosídeos e enzimas que serão abordados em algum momento em nosso estudo. As cores das enzimas e das setas correspondem à ação da enzima sobre seu substrato (anterior a seta), levando a seu respectivo produto (posterior a seta)

76

As glicosiltransferases são enzimas responsáveis pela biossíntese dos glicoconjugados. Estas enzimas se localizam no RE-Golgi e são responsáveis pela adição progressiva de monossacarídeos em glicoconjugados nascentes. Os monossacarídeos são ativados por nucleotídeos (formando, por exemplo, CMP-siálico ou UDP-GalNAc) que são

transferidos para o gliconjugado nascente, também chamado de precursor ou acceptor. A grande variedade nos glicoesfingolipídios pode ser atribuída à atividade combinatória entre as diferentes glicosiltransferases. Entre as glicosiltransferases, há aquelas que transferem resíduos de ácido siálico, e por isto são denominadas sialiltransferases. O número de diferentes sialiltransferases clonadas já passa de 20, algumas delas são essenciais para biossíntese de gangliosídios ^{76,107,123}.

As glicosiltransferases atuam em complexos na síntese de gangliosídios no retículo endoplasmático-Golgi. Através do ensaio de análise da cinética de múltiplas enzimas (MEKA-“multienzyme kinetic analysis”) foi identificada a cooperação entre várias glicosiltransferases. Estes complexos enzimáticos facilitarão a síntese e transporte rápido dos gangliosídios entre as diferentes glicosiltransferases catalisando os passos subseqüentes de sua biossíntese ¹⁰, estas estruturas supramoleculares garantirão a processividade da biossíntese de gangliosídios. Os ensaios MEKA mostraram que as enzimas *G_{D3} sintase* e *G_{M2}/G_{D2} sintase* formam freqüentemente um complexo multienzimático que facilita a biossíntese dos gangliosídios da série-b. Neste trabalho os autores utilizaram proteínas híbridas, ou seja, glicosiltrasferases específicas (ST1 (*G_{M3} sintase*), ST2 (*G_{D3} sintase*) e GalNAcT (*G_{M2}/G_{D2} sintase*)) híbridas com proteínas fluorescentes e epitopos antigênicos (ST1-FLAG-YFP, ST2-FLAG-GFP e GalNAcT-FLAG-YFP). Estas construções foram transfectadas em células de neuroblastomas de rato F-11 e observaram que ST2 e GalNAcT localizavam no mesmo compartimento do RE-Golgi, mas não interagiam com ST1 que se

localizava em outro compartimento do Golgi. Após a transfecção de ST2 na linhagem F-11 era esperado inicialmente um acúmulo de G_{D3} , como nas células somente transfectadas com GalNAcT um predomínio de gangliosídios da série-a e alguns traços de gangliosídios da série-b devido a baixa atividade das enzimas endógenas em cada situação. Entretanto, o que se observou foi um aumento predominante dos gangliosídios da série-b em ambos transfectantes. A superexpressão de ST2 induziu um aumento na expressão endógena de GalNAcT; e reciprocamente a superexpressão de GalNAcT levou a um aumento em ST2. Estes resultados corroboram com a hipótese de um complexo enzimático entre ST2 e GalNAcT. Pouco se sabe do controle transcricional destas enzimas ¹⁰.

As sialiltransferases são relevantes para o processo neoplásico por várias razões:

1. a carga negativa dos ácidos siálicos através do seu efeito repulsivo pode impedir interações celulares;
2. as estruturas de siálicos podem ser reconhecidas por moléculas de adesão celular como selectinas ou membros da família dos siglecs.
3. a adição de ácidos siálicos pode mascarar estruturas de açúcar, evitando assim o reconhecimento por outras moléculas lectina-símile, como galectinas.
4. o elemento regulatório de genes da sialiltransferases podem ser alvos de vias de sinalização específicas. Algumas sialiltransferases são específicas da biossíntese dos gangliosídios, como as G_{M3} sintase e a G_{D3} sintase que sintetizam G_{M3} e G_{D3} respectivamente. G_{M3} e G_{D3} são

os precursores das séries-a e b respectivamente e são convertidos em G_{M2} e G_{D2} pela ação da glicosiltransferase, G_{M2}/G_{D2} sintase²⁸.

A regulação alterada destas enzimas em células cancerosas parece levar ao um desvio no metabolismo dos gangliosídios favorecendo ora o crescimento, ora a adesão ou motilidade celular em diferentes modelos.

A sialiltransferase alvo de nosso estudo é a G_{D3} sintase, também denominada como ST2 e ST8-Sia I^{50,122}. Esta enzima é altamente específica quanto ao seu substrato convertendo G_{M3} em G_{D3} . No processo de transformação celular o controle desta enzima parece estar alterado^{17,28}. Após sua clonagem foram desenvolvidos muitos estudos abordando a expressão de gangliosídios endógenos. G_{D3} está presente no melanócito normal e em fases mais precoce da progressão tumoral. G_{D2} e derivados de G_{D3} como 9-O-acetil- G_{D3} ¹¹⁰ acumulam-se nas fases mais tardias da progressão tumoral dos melanomas^{23,86,99,104}. Como em células de melanomas, células de neuroblastomas apresentam um acúmulo de G_{D2} e/ou G_{M2} . O acúmulo de G_{M2}/G_{D2} é devido a expressão aumentada de G_{M2}/G_{D2} sintase e baixa atividade de G_{D3} sintase, indicando que a expressão basal de G_{D3} sintase é suficiente para a síntese de G_{D2} ¹⁰⁵. Entretanto, as células de neuroblastoma produzem tumor em camundongos atímicos e estes tumores apresentam níveis aumentados de G_{D3} sintase, sugerindo um papel deste gangliosídio no crescimento tumoral *in vivo*¹³⁴. Consistentemente outros autores mostraram que células de neuroblastomas de rato (F-11), que expressam altos níveis de G_{D3} sintase, quando tratadas com antissenso da

enzima mostraram uma redução significativa no crescimento de tumores em camundongos atímicos ¹³³.

Várias abordagens vêm sendo utilizadas no estudo dos gangliosídios endógenos, seja pelo seu bloqueio ^{2,135} ou sua expressão aumentada. Inibidores da glucosilceramida sintase e oligonucleotídeo antisense têm sido utilizados no bloqueio de gangliosídios em diferentes passos da via de sua biossíntese (Figura 2). Inicialmente utilizou-se o inibidor da enzima glucosiltransferase, *d*-treo-1-fenil-2-decanoilamino-3-morfolino-1-propanol (PDMP). Esta molécula foi utilizada em vários estudos mas havia um acúmulo de ceramida e produtos metabólicos como esfingosina-1-fosfato que podem atuar como segundo mensageiro e afetar o crescimento celular. Recentemente outro inibidor de glucosiltransferase foi caracterizado, o *d*-1-treo-1-fenil-2-hexadecanoilamono-3-pirrolidino-1-propanol-HCl (PPPP), este não acumula os produtos secundários ⁹⁰. Células de melanoma murino (MEB4) tratadas com PPPP, depletadas de glicoesfingolipídios, mostraram uma redução na tumorigênese e metastase *in vivo*, mas a proliferação *in vitro* não foi alterada ¹²⁸. Em outro contexto estas células foram transfectadas com o antisense da glucosiltransferase reduzindo o potencial tumorigênico e metastático destas células ³¹.

A transfecção estável de enzimas pertencentes a biossíntese dos gangliosídios favorece a expressão endógena dos gangliosídios. Em melanoma murino (B16) a expressão de G_{D3} e G_{D2} foram obtidas pela co-transfecção de G_{M2}/G_{D2} sintase e G_{D3} sintase gerando a linhagem B78-D4. Estas células injetadas no subcutâneo do camundongo geravam tumores.

Após o tratamento com IL-2 em fusão com um anticorpo recombinante de murino humanizado (ch14.18) que reconhece G_{D2} observaram a redução parcial do tumor implantado ⁴. A sublinhagem, P29, de câncer de pulmão de camundongo do tipo Lewis produz metástase quando injetada na cauda de camundongo (metástase experimental). Após a transfecção do gene de G_{M2}/G_{D2} sintase, estas células passaram a expressar G_{M2} e seu potencial metastático foi reduzido ²⁰. Em tumores de estômago e coloretal foi observado a diminuição na expressão de G_{D3} sintase e o aumento da expressão da G_{M2}/G_{D2} sintase quando comparados com o tecido normal, resultando em um possível acúmulo de G_{M2} nestes tumores ⁶². Como dito anteriormente o controle transcricional destas enzimas não está totalmente esclarecido. Assim é importante conhecermos a estrutura gênica destas enzimas.

1.4.1. Controle Transcricional da G_{M2}/G_{D2} Sintase

No controle da síntese de dissialogangliosídios, G_{D3} e G_{D2} , a expressão da G_{D3} sintase como da G_{M2}/G_{D2} sintase são determinantes. Estas enzimas são expressas em vias restritas durante o desenvolvimento dos órgãos e a diferenciação celular. O conhecimento da expressão destas glicosiltransferases é importante principalmente para a neurobiologia e biologia dos tumores. O controle transcricional da G_{D3} sintase é pouco conhecido e apresenta alguns aspectos semelhantes ao da G_{M2}/G_{D2} sintase ^{37,38}.

A G_{M2}/G_{D2} *sintase* é expressa em tumores derivados de células da crista neural, leucemia de células T em adultos e no tecido nervoso em desenvolvimento, sendo que esta expressão é aumentada gradualmente durante o desenvolvimento do cérebro dos murinos até antes do nascimento. A expressão específica de G_{D2} e a possível transativação do gene da G_{M2}/G_{D2} *sintase* pelo vírus linfotrófico de células T tipo 1, através da proteína $p40^{TAX}$, tem sido relatado em leucemias de células T de adulto ³⁶. A região codificadora do gene da G_{M2}/G_{D2} *sintase* consiste em 11 exons, correspondendo a uma extensão de 8Kb. Três variantes de “splicing” alternativo são descritos. Como promotor de várias glicosiltransferases, entre elas também a G_{D3} *sintase*, a G_{M2}/G_{D2} *sintase* não possui TATA ou CCAAT boxes. Neste grupo de enzimas observam-se múltiplos sítios de iniciação de transcrição, usados de maneira tecido-específica ^{37,38,48,108}.

A G_{M2}/G_{D2} *sintase* na sua porção 5' não traduzida apresenta sítios consenso de ligação para fatores de transcrição do tipo: EGR-1, HNF-5 e Sp-1 flanqueando a região 5' do exon 1a; Sp-1 e AP-2 flanqueando a região 1b; e AP-2 e dois sítios S1HS na região do exon 1c. EGR-1, conhecido também como NGF1-A, Krox24 e Zif268, está expresso principalmente no cérebro, timo, pulmão e coração de murinos. HNF-5 é uma proteína ligante de DNA, é especificamente expressa no fígado; e sítios HNF são presentes em seqüências regulatórias múltiplas de outros genes expressos também especificamente no fígado. AP-2 é um fator de transcrição expresso nas células da crista neural. O sítio S1HS é o sítio S1 nuclease-sensível no

promotor do gene EGFR (receptor do fator de crescimento epidermal) associado a proteínas ligantes de DNA^{39,108}.

Os “splicings” alternativos entre o exon 1 (1a ou 1b) e 1a estão envolvidos na expressão diferencial do gene. Esta maquinaria é alternativamente usada por vias de diferenciação de linhagens de linfoblastos B linfoblásticas. Em três linhagens estudadas o promotor de *G_{M2}/G_{D2} sintase* apresentou um elemento amplificador (*enhancer*) entre os nucleotídeos -2228 e -810. Assim, o mecanismo de regulação da transcrição de *G_{M2}/G_{D2} sintase* nestas células parece ser bem mais complexo¹⁰⁸. Em uma abordagem *in silico*, usando o programa Patsearch⁴² comparamos a organização dos genes *G_{D3} sintase* e *G_{M2}/G_{D2} sintase*. Apesar de semelhantes elementos regulatórios, a análise *in silico* permitiu a identificação de elementos responsivos a p53⁵¹ em *G_{M2}/G_{D2} sintase*; mas não na *G_{D3} sintase* (ver anexo 1).

1.5.BALSAS LIPÍDICAS (“LIPIDS RAFTS”)

Estudos de distribuição de gangliosídeos sintetizados endogenamente (como o *G_{M1}*, *G_{M3}*, *G_{D2}* e *G_{D3}*, em linhagens de melanomas humanos) demonstraram que estes se localizam preferencialmente nas placas de adesão, em microdomínios especializados da membrana plasmática. Estudos *in vitro* mostraram que estes gangliosídeos encontravam-se no “pellet” de extração de membranas com detergentes não desnaturantes, como Triton X-100 e Brij, utilizando-se uma centrifugação simples a 4^oC.

Esta fração foi denominada por alguns autores de GEM (“GSL-enriched microdomain”) ^{22,32,45,61}. G_{M1} e G_{M3} , por exemplo, apresentam distribuição assimétrica em linfócitos T migratórios (polarizados); no uropódio, concentram-se moléculas de adesão como CD44, ICAM, β_1 integrinas e G_{M1} ; enquanto presentes nos lamelipódios das células estão FAK, talina e G_{M3} ^{41,56}. O papel de gangliosídios na estabilidade ou função de proteínas presentes na placa de adesão (por exemplo, integrinas) ainda não está totalmente esclarecido. Em linhagem de queratinócitos humanos, SCC12, observou-se a associação física entre $\alpha_5\beta_1$ - integrina e G_{T1b} e G_{D3} , usando-se ensaios de imunoprecipitação ^{124,125}.

HARDER e SIMONS ⁴⁹ escreveram sobre as evidências de associações entre glicoesfingolipídios e colesterol formando plataformas que servem de suporte para numerosos eventos celulares que envolvem tráfego de membranas e transdução de sinal. Estas formações foram chamadas de “rafts” ou balsas, que funcionariam como estruturas supramoleculares que concentram algumas proteínas, como tetraspaninas e integrinas, enquanto que outras proteínas são excluídas destas regiões ¹¹³. As forças responsáveis pela formação destes “rafts” se baseiam nas interações lipídicas que por si só são fracas. “Rafts” de esfingolipídios são considerados estruturas dinâmicas. Há controvérsias sobre o papel de colesterol na manutenção destes microdomínios. Postula-se que colesterol atue mantendo a estabilidade destes “rafts” ⁴⁹.

1.5.1. Integrinas e Tetraspaninas

Como já mencionado as integrinas são glicoproteínas que atuam na adesão celular como receptores envolvidos nas interações célula-matriz e célula-célula. Elas são proteínas transmembranares, com uma extremidade externa e uma outra extremidade citoplasmática. As interações via integrinas são capazes de ativar diferentes vias de sinalização como: sobrevivência, proliferação, diferenciação e migração celular. Elas são consideradas efetoras de processos como a adesão e migração celular. Algumas integrinas estão alteradas durante o processo oncogênico, como discutido em outros tópicos acima ^{95,96}.

A migração dos melanócitos névicos ou células de melanoma para a derme é mediada por integrinas, que podem agir como receptores de elementos da matriz extracelular. A migração pela membrana basal proteolisada parece ser mediada por integrinas que reconhecem a glicoproteína laminina. Nesta condição, parece que as integrinas $\alpha_6\beta_1$ e $\alpha_7\beta_1$ são os principais efetores da saída de “melanócitos” da epiderme para a derme. Outras integrinas, como $\alpha_v\beta_3$, são fundamentais para migração pelo estroma intersticial nas fases mais avançadas da doença ⁶³.

WANG et al. ¹²⁷ mostraram que o acúmulo de G_{M3} suprime a migração e a invasão na linhagem SCC12 através da inibição da ativação metaloprotease-9 (MMP-9). Este gangliosídeo facilita o rompimento da associação de MMP-9 com $\alpha_5\beta_1$ integrina. Em outro trabalho deste mesmo grupo, eles mostraram a modulação de G_{M3} no “cross-talk” do receptor do

fator de crescimento epidermal (EGFR) e β_1 integrina. O acúmulo de G_{M3} bloqueia a ativação de EGFR induzida pela fosforilação de resíduos tirosina específicos do receptor ¹²⁶.

Outras moléculas encontram-se associadas as integrinas no plano da membrana plasmática, como por exemplo, CD9, CD81, CD82, CD63 e CD151, membros de uma super-família de proteínas conhecidas como tetraspaninas. Estas moléculas se associam a β_1 integrinas, como $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_4\beta_1$ e $\alpha_6\beta_1$ integrinas, modulando suas funções ⁸. Em alguns tipos de tumores a expressão de CD9, CD63 e CD82 é inversamente relacionada ao potencial metastático; em alguns tipos celulares, CD9 modula positivamente a resposta migratória dependente de integrinas ⁷. Em linhagens de carcinoma de cólon, as quais expressam níveis altos de CD9, a migração apresenta-se aumentada em relação a uma linhagem de tumor gástrico, que expressa níveis baixos de CD9. O aumento da migração é revertido na primeira linhagem quando esta é acrescida de G_{M3} exógeno. Em contraste, não ocorre a inibição da migração nas linhagens de tumores gástricos que apresentam baixos níveis de expressão de CD9 na presença de G_{M3} exógeno. Após a transfecção do cDNA de CD9, nas linhagens que apresentavam níveis baixos de CD9, passaram a apresentar um fenótipo mais metastático. Estas evidências sugerem que G_{M3} inibe a migração celular facilitada por CD9 ^{59, 92}.

A adesão celular mediada por $\alpha_5\beta_1$ e CD82 é otimizada na presença de G_{M3} . Em contrapartida, G_{M3} favorecendo positivamente a adesão, modula negativamente a migração neste modelo ⁹³. A atividade de modulação das

tetraspaninas depende de sua interação física com a molécula de integrina. Evidências indicam que estas interações ocorrem nestas balsas lipídicas (“lipid rafts”), que devido a sua composição lipídica favorecem a partição e organização de maquinarias protéicas associadas a transdução de sinal ⁹⁴.

Como sugerem alguns estudos, os gangliosídios G_{M3} e G_{D3} distribuem-se em balsas lipídicas, colocalizando com quinases como *c*-Src, Rho A e Lyn ^{58,130}, sugerindo um papel destes gangliosídios como moduladores de quinases que não só as associadas a receptores de fatores de crescimento. Estes estudos mostraram que os gangliosídios coparticionam com estas quinases quando extratos celulares, que são feitos usando-se detergentes não iônicos. Mais recentemente, simulando uma reconstrução de GSD (“Glycosignaling Domain”), alguns autores verificaram a associação de *c*-Src, RhoA, Lyn e FAK com G_{M3} ^{41,56}. HAKOMORI ⁴⁴ postula que gangliosídios e glicosíngolipídios, por sua localização em domínios especializados da membrana plasmática enriquecida em moléculas envolvidas em transdução de sinal sejam fundamentais no processo de integração de sinais de proliferação, adesão e migração celular. Uma vez verificada, a função modulatória de gangliosídios poderia justificar a vantagem seletiva que estas moléculas conferem a células neoplásicas ao longo da progressão tumoral.

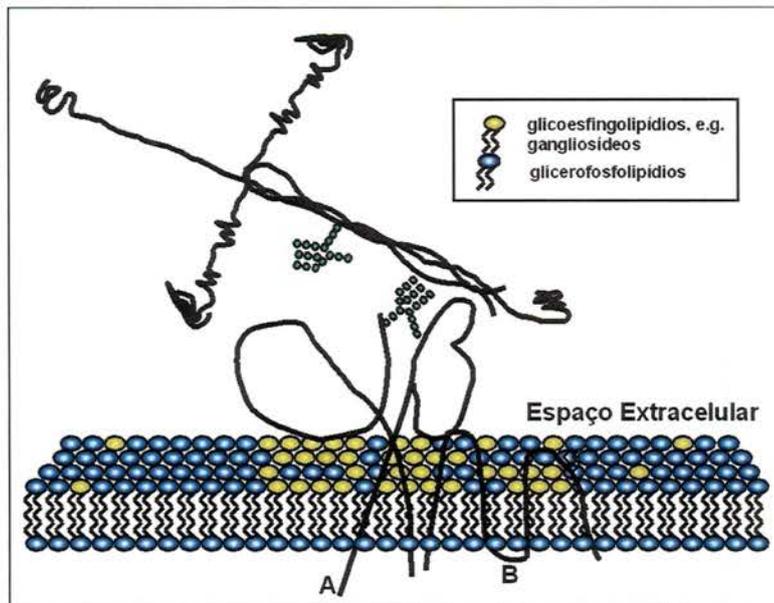


Figura 3: Esquema proposto da estrutura supramolecular dos pontos de contato; um exemplo de microdomínio especializado da membrana plasmática: Evidências crescentes indicam que, apesar de fluida, a membrana não é homogênea quanto a distribuição de glicerofosfolipídios e glicoesfingolipídios. Os glicerofosfolipídios são mais abundantes. Os glicoesfingolipídios tendem a se associar em estruturas chamadas balsas lipídicas; por partição algumas proteínas são residentes nestas balsas, como integrinas (A) e tetraspaninas (B). Esta estrutura é provavelmente dinâmica, favorecendo o recrutamento de moléculas envolvidas nas respostas de adesão e migração celular, por exemplo.

1.6.APOPTOSE E G_{D3}

Além de marcador tumoral, G_{D3} também é um marcador de atividade linfocitária. Há uma correlação positiva entre a expressão de G_{D3} e proliferação celular. De maneira análoga, por muito tempo assumiu-se que a expressão de G_{D3} estaria associada ao estado de proliferação celular de linfócitos ativados. Contudo, DE MARIA et al. ²⁹ propuseram que a relação entre G_{D3} e ativação linfocitária não seja tão simples como se imaginava.

Estes autores mostraram que a indução de morte celular (apoptose) induzida por Fas-Fas ligante é acompanhada de expressão aumentada da G_{D3} sintase e conseqüente acúmulo de G_{D3} . O bloqueio da indução de G_{D3} sintase usando-se oligonucleotídeos anti-senso é acompanhado de resistência a apoptose induzida pelo engajamento de Fas-Fas ligante. Estes resultados sugerem que G_{D3} seja um elemento "downstream" no processo de morte celular induzida por Fas-Fas ligante. A base deste efeito dual de G_{D3} , ora associado à proliferação celular, ora associado à morte celular, é ainda desconhecida.

Recentemente este papel dual de G_{D3} foi observado em células vasculares do músculo cardíaco (VSMC), nestas células ora G_{D3} favorece a proliferação e ora a morte celular. A expressão aumentada de G_{D3} decorrente da expressão forçada da G_{D3} sintase inibiu a síntese de DNA e a fosforilação de ERK (extracelular signal-regulated kinase) na presença de PDGF ("platelet-derived growth factor"). A supressão de G_{D3} sintase destas células está correlacionada com a regulação negativa de ciclina E/CDK2, e a regulação positiva de p21 e inibição de p27; conseguinte o aumento de p53. A expressão de G_{D3} sintase também inibiu a expressão de MMP-9 via indução por TNF- α na linhagem de células VSMC ⁸³.

Existem diferentes abordagens experimentais para depletar o conteúdo de gangliosídios em células. Por exemplo, SUN et al. ¹¹⁷ conseguiram a depleção total dos gangliosídios em linhagem celular de queratinócitos (SCC12), após a transfecção estável de sialidases específicas de gangliosídios. Neste trabalho observaram um aumento da aderência,

espraiamento e migração destas células em matriz de fibronectina. A ausência dos gangliosídeos conferiu aos queratinócitos resistência a apoptose induzida por estaurosporina ou ácido acetil-salicílico ou deprivação de soro por mecanismos envolvendo estímulo da atividade quinase de ILK/PKB/AKT e fosforilação de BAD. O efeito pró-apoptótico é revertido na presença do anticorpo anti-G_{T1b}^{117,125}.

Culturas primárias de neurônios da camada granulosa do cerebelo de ratos (Sprague-Dawley) são usualmente cultivadas sob condições crônicas de despolarização (meio contendo 25 mM de cátions K⁺). Estas condições favorecem a maturação e sobrevivência destas células. Assim nestas culturas pode-se induzir a apoptose pela alternância de baixas concentrações de K⁺ no meio, independente da presença de soro fetal bovino. Neste modelo, o fenômeno da apoptose foi sempre precedido por um aumento dos níveis de G_{D3} intracelular 2-6 horas após a indução apoptose, e cessa após 12 horas da indução. Neste caso G_{D3} exógeno acelerou apoptose, enquanto G_{D1a} não alterou o processo apoptótico. Além disto, o tratamento com oligonucleotídeo antisense para o gene da G_{D3} *sintase* protegeu os neurônios da apoptose⁸¹.

Em linhagem celular de músculo cardíaco humano (H-ASMC), a incubação com baixas concentrações de G_{D3} (2,5-10 μM) por intervalos curtos de tempo (10-30min) estimulam a geração de superóxido via ativação de NADPH e NADH oxidase. Nestas células, a produção de superóxidos por G_{D3} parece estimular a proliferação via p44 MAPK. Em contraste, em altas

concentrações (50-200 μM), $\text{G}_{\text{D}3}$ estimula a formação de óxido nítrico levando a eventos de sinalização da apoptose ⁹.

Estudos *in vitro* mostram que o dissialogangliosídeo $\text{G}_{\text{D}3}$ induz diretamente a alteração de permeabilidade de mitocôndrias, associadas ao escape de citocromo c, que no citoplasma, induziria a ativação de caspase ^{89,109}. Esta interação parece ser dependente de BCL-2 ^{103,121}. $\text{G}_{\text{D}3}$ altera o potencial de membrana da mitocôndria pela geração de espécies reativas de oxigênio (ROS). Este efeito é independente da presença do colesterol ²⁵. Os efeitos no potencial de membrana da mitocôndria foram específicos de $\text{G}_{\text{D}3}$, já que nem $\text{G}_{\text{D}1\text{a}}$ ou $\text{G}_{\text{M}3}$ induzem a perda de potencial transmitocondrial, a transição de permeabilidade de membrana mitocondrial (MPT) ¹⁰⁹.

Recentemente foi observada a indução à apoptose via $\text{G}_{\text{D}3}$ em células vascular endotelial, ECV304. Após a transfecção de $\text{G}_{\text{D}3}$ sintase e como consequência o acúmulo de $\text{G}_{\text{D}3}$, estas células passaram a regular negativamente a expressão de BCL-2 via desfosforilação de Akt e CREB (“cyclic-AMP responsive element binding protein”). A apoptose nestas células foi evidenciada pela ativação da caspase-3 ⁴³. Em uma linhagem de células de carcinoma de mama, SKBR3, $\text{G}_{\text{D}3}$ e $\text{G}_{\text{D}1\text{b}}$ exógenos promovem a apoptose principalmente em altas concentrações ⁷⁵.

Um ponto pendente quanto à relevância fisiológica desta interação recai sobre a distribuição topográfica de $\text{G}_{\text{D}3}$, freqüentemente associada a membranas plasmáticas e lisossomos (quando do processo de sua degradação). É possível que gangliosídios derivados de $\text{G}_{\text{D}3}$ exerçam estas funções. GARCÍA-RUIZ et al. ⁴⁰ mostraram que lactosilceramida, um

precursor dos gangliosídios, de distribuição sabidamente intracelular, exerceria o mesmo efeito que G_{D3} .

A função pró-apoptogênica de G_{D3} foi confirmada independentemente por diferentes grupos. Restam ainda pontos a serem esclarecidos. É importante ressaltar que apesar de um possível efeito apoptogênico de G_{D3} , células de melanoma acumulam este dissialogangliosídeo. Por que o efeito apoptogênico de G_{D3} não se manifesta nestas células? Uma possibilidade é que G_{D3} seja convertido em outros gangliosídios não apoptogênicos, como G_{D2} e 9-O-acetil- G_{D3} . Isto foi recentemente mostrado para o derivado 9-O-acetil- G_{D3} ^{21,77}, que não induz apoptose. Alternativamente as células de melanoma que mantêm altos os níveis de G_{D3} podem ter sido selecionadas por não apresentarem elemento da cascata apoptótica induzida por G_{D3} . Uma célula que expressa G_{D3} pode simultaneamente silenciar genes que estejam à jusante da via induzida por citocromo *c*, assim a cascata apoptogênica é iniciada, porém não concluída. De fato, células de melanoma metastático, que acumulam G_{D3} , têm o gene APAF-1 silenciado¹¹⁴.

1.7 MODELO DE MELANOMA MURINO PARA AVALIAÇÃO DA PROGRESSÃO TUMORAL

A linhagem pigmentada de melanócitos, melan-a, foi derivada de melanoblastos epidérmicos normais de embriões de camundongo C57/bl-6. A linhagem melan-a apresenta um número cromossômico diplóide e ao ser injetada em camundongos singenéticos não é capaz de gerar tumores⁶. A partir desta linhagem foram selecionadas e clonadas diferentes variantes

tumorigênicas, algumas delas melanóticas (por exemplo, clone TM5) e outras amelanóticas (por exemplo, clone TM1). As linhagens TM1 E TM5 são facilmente transplantadas e crescem como tumores quando injetadas por via subcutânea em animais C57/bl-6 ²⁶. O sistema melan-a, TM1 e TM5 representa assim um modelo adequado para mapear os eventos celulares e moleculares que ocorreriam na transição entre uma lesão pré-maligna ou de melanoma de crescimento radial (melan-a) e o melanoma de crescimento vertical (linhagens TM1 e TM5, por exemplo).

2.OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Pretende-se avaliar a função de dissialogangliosídios, com ênfase em G_{D3} e seus derivados, em elementos do fenótipo transformado de melanomas. Espera-se assim compreender a vantagem seletiva que células G_{D3}^+ apresentam sobre as células G_{D3}^- ao longo da progressão tumoral de melanomas.

2.1.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Transfectar de maneira estável o gene da G_{D3} *sintase* humana nas linhagens celulares de melanócitos e melanoma murino, melan-a e TM1 respectivamente.
2. Avaliar o efeito da expressão de G_{D3} *sintase* em parâmetros da cinética celular, adesão e migração em substratos definidos em todos os transfectantes G_{D3}^+ , comparando-os com as células parentais e transfectante controle;
3. Avaliar a distribuição subcelular de dissialogangliosídios, especialmente sua distribuição em células aderidas e em substratos específicos, e sua relação com elementos da placa de adesão focal, e o fenótipo migratório;

4. Avaliar o efeito da expressão de G_{D3} sintase e conseguinte remodelamento dos gangliosídios no potencial tumorigênico e metastático das células derivadas de TM1, utilizando-se o modelo murino singenético (camundongos C57bl/6).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. CÉLULAS E ANTICORPOS

As linhagens celulares de melanócitos “normais” murinos (melan-a)⁶ e suas sublinhagens geradas a partir da transfecção com o plasmídeo pcDNA-3 sem o inserto, ou com os insertos (a sialiltransferases: ST8Sial) foram mantidas em meio RPMI-1640 (Sigma, St. Louis, MO), pH 6.9 com 5% de soro fetal bovino (Gibco BRL, Argentina) e, quando indicado na presença de 200 nM de éster de forbol (PMA, Sigma, St. Louis). Os clones de ME-ST8D4, ME-ST8D16 foram obtidos a partir de subculturas de ME-ST8Sial plaqueadas em diferentes densidades (inóculo inicial de 1:4 e 1:16 respectivamente). A linhagem tumorigênica TM1 foi clonada através do crescimento independente de ancoragem da linhagem de melanócitos murinos melan-a²⁶. Este é um clone tumorigênico amelanótico. A linhagem TM1 foi mantida em meio RPMI-1640 (Sigma, St Louis, MO), pH 6.9 com 5% de soro fetal bovino (Gibco BRL, Argentina). As culturas são mantidas a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO₂. Após transfecção, as células foram mantidas sob pressão seletiva, na presença de geneticina (G418, concentração do antibiótico ativo de 1.4 mg/mL). A concentração tóxica de geneticina foi determinada previamente a transfecção, as demais condições de cultivo são idênticas às da célula parental. A linhagem de melanoma

humano SK-MEL28 foi cultivada em RPMI-1640, pH 7,4 suplementado com 10% de soro fetal bovino.

Os repiques foram feitos sistematicamente quando as células atingem cerca de 90% de confluência e plaqueadas em densidade de 20% a 30% da densidade inicial a cada 3 dias. Para o repique e os ensaios as células foram tripsinizadas com uma mistura de tripsina e Versenne (ATV) (Instituto Adolfo Lutz, São Paulo) a 37°C por 2 minutos. A tripsina era inativada em meio com soro. Para os ensaios, as células em fase de crescimento logarítmica eram lavadas com PBS e ressuspendidas em meio adequado (meio de cultura ou PBS). O número de células foi estimado por contagem direta em hemocitômetro (câmara de Neubauer).

O hibridoma R24 que secreta uma IgG₃, anti-G_{D3}, foi adquirido da “American Tissue Culture Collection” e foi cultivado em RPMI-1640 mais 10% de soro fetal bovino em condições de cultura ⁹⁹. O anticorpo monoclonal GMR6 ⁶⁴ uma IgM anti-G_{M3} foi gentilmente cedido pelo Dr. Tadashi Tai, The Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science, Japão. O DH2, anticorpo anti-G_{M3} foi gentilmente cedido pelo Prof. S. Hakomori (Pacific Northwestern Research Institute, Seattle). O anticorpo Jones (Sigma, St Louis, MO) uma IgM anti-9-O-acetil-G_{D3} ¹⁴. O anticorpo, anti-β₁-integrina, CD29 conjugado a FITC (Pharmigen, San Diego CA). O anticorpo policlonal de coelho, anti-β₁-integrina (anti-FNR) e o anti-β₃-integrina (anti-VNR) foram gentilmente cedido pelo Dr. E. Ruoslohti (Burnhan Institute, La Jolla-CA).

3.2. ENSAIO DE SENSIBILIDADE A GENETICINA

As células transfectadas (melan-a e TM1) com os plasmídeos pcDNA-3 e pc-DNA-3/ST8Sial expressaram o gene de resistência a geneticina (G418, GibcoBRL, Grand Island, NY). Portanto, nós determinamos a concentração ótima de geneticina nestas células. Para tanto, as células foram cultivadas com meio RPMI acrescido de 5% de soro bovino fetal e mantidas em atmosfera de 5% de CO₂. No 2º dia o meio foi substituído pelo meio contendo o antibiótico G418 nas concentrações de 400, 600, 800, 1000, 1200, 1400 µg/ml. A cada 3 dias as células foram lavadas e o meio substituído. As células foram observadas diariamente e no fim do 10º dia o número de células viáveis foram contadas em câmara de Neubauer e a viabilidade avaliada com azul de trypan 0,1%. A concentração de geneticina para seleção das células a serem transfectadas foi estabelecida. A dose necessária para matar todas as células após 10 dias de cultivo foi de 1,4 mg/mL de G418.

3.3. EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DOS PLASMÍDEOS

Para extração e purificação dos plasmídeos pcDNA3, ST8/pcDNA3 usados para transfecção das células TM1 foi usado o kit nucleobond plasmid purification - midi prep (CLONTECH, Palo Alto, CA). Nucleobond AX é uma resina de sílica de troca-iônica usada para separar diferentes classes de ácidos nucléicos. Este grupo funcional tem uma densidade de carga total

alta, o que permite que a carga negativa do fosfato do RNA ou DNA se ligue com grande especificidade à resina. As esferas têm tamanhos uniformes e contém poros largos.

O kit nucleobond™ emprega um protocolo de lise por álcali¹³ e SDS modificado para extração e purificação plasmidial de bactérias. Tanto o DNA cromossomal como o DNA plasmidial são desnaturados sob condições alcalinas. Quando o acetato de potássio é adicionado ao lisado desnaturado, há a formação de um precipitado que contém o DNA cromossomal e outros componentes celulares. Além disso, esse tampão neutraliza o lisado. O DNA plasmidial, que permanece em solução, é revertido para sua estrutura nativa supercoiled. Depois da coluna ser equilibrada com o tampão apropriado, o plasmídeo é purificado do homogeneizado e pode ser dissolvido em água.

O material precipitado (da colônia de bactérias) foi ressuspenso gentilmente em 8,0 ml do tampão Tris-HCl 50 mM, EDTA 10 mM com 100 µg de RNase A e foi adicionado 8,0 ml do tampão NaOH 200 mM, contendo 1% SDS à suspensão. Esta foi misturada por inversão e incubada a temperatura ambiente por 3 minutos. Foi então adicionado 8,0 ml do tampão acetato de potássio 2,8 M, pH 5.1 e a suspensão foi misturada por inversão e incubada em gelo por 5 minutos. A suspensão foi filtrada em filtro pré-umedecido com algumas gotas do tampão Tris 100 mM, KCl 900 mM, 15% de etanol, pH 6.3. A coluna AX 100 foi equilibrada com 2,0 ml deste tampão e o lisado transferido para coluna. O fluido escorreu até a coluna ser esvaziada e o filtrado foi descartado. A coluna foi então lavada com o tampão Tris 100 mM, KCl 1.15 M, 15% de etanol, pH 6.3 por 3 vezes e o

filtrado descartado. A eluição do DNA plasmidial foi feita com 5,0 ml do tampão Tris 100 mM, KCl 1 M, 15% de etanol, pH 8.5. Este tampão foi pré-aquecido a 45°C para melhor rendimento. Em seguida, o plasmídeo foi precipitado com 3,5 ml de isopropanol. O precipitado foi centrifugado a 10000xg por 30 minutos a 4°C e foi adicionado etanol 70% ao material precipitado. O material precipitado foi ressuspendido em vórtex brevemente e centrifugado a 10000xg por 5 minutos a temperatura ambiente. Nessa etapa, o excesso de sais foi removido do plasmídeo. O etanol foi retirado gentilmente e o material precipitado colocado para secar a temperatura ambiente por 10 minutos. O material precipitado foi então redissolvido em água deionizada estéril e o rendimento determinado por espectrofotometria (medida de absorbância a 260 e 280 nm). A seguir a integridade do DNA plasmidial foi confirmada em gel de agarose (1,5 %).

3.4. DIGESTÃO DO PLASMÍDEO COM ECO-RI E HINDIII

Eco-RI e HINDIII (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD) são enzimas de restrição reconhecem seqüências de bases específicas na dupla hélice de DNA e clivam ambas as fitas da hélice nos seus respectivos sítios. O plasmídeo pcDNA3, só contém um sítio de restrição para a enzima Eco-RI e um para HINDIII, aonde foi clonado o gene *G_{D3} sintase*, que por sua vez não apresenta nenhum sítio de clivagem para ambas enzimas. Para confirmar a integridade dos plasmídeos pcDNA3 e ST8pcDNA3 purificados, 1 µg do DNA plasmidial foi digerido com 1 µl da enzima Eco-RI e HINDIII (10U/µl)

durante 1 hora a 37°C. Após a digestão, a reação foi interrompida por 15 minutos a 75°C. Em seguida, as amostras foram corridas em gel de agarose 1,5% em TBE 1x (Tris 90 mM, ácido bórico 90 mM, EDTA 50 mM, pH 8,0), TBE também foi usado na separação eletroforética, na presença de brometo de etídeo (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD) e o tamanho das bandas observado.

3.5. TRANSFEÇÃO

Os plasmídeos pcDNA3 e ST8/pcDNA3 foram utilizados na transfecção estável das linhagens celulares melan-a e TM1 por lipofecção. Numa placa de 12 poços (4 cm²) foram plaqueadas 3,0x10⁵ células em 1 ml de meio (RPMI) contendo 5% de soro fetal bovino. Quando atingiram 90% de confluência, as células foram transfectadas com os plasmídeos pcDNA3 e ST8/pcDNA3. Foram preparadas duas soluções: a solução A contendo 2 µg do plasmídeo diluídos em 100 µL de meio OPTI-MEM sem soro (GIBCO BRL, Grand Island, NY). Os plasmídeos pcDNA3 ou ST8/pcDNA3 foram utilizados na transfecção estável da linhagem celular TM1 por lipofecção. Numa placa de 35, 60 ou 90 mm foram plaqueadas as células em RPMI contendo 5% de soro fetal bovino. Quando atingiram 90% de confluência, as células foram transfectadas com os plasmídeos pcDNA3 ou ST8/pcDNA3. Foram preparadas duas soluções. A solução A contendo o plasmídeo diluído em meio OPTI-MEM sem soro (GIBCO BRL, Grand Island, NY). OPTI-MEM é uma modificação do MEM (Eagle's), tamponado com HEPES e

bicarbonato de sódio, e suplementado com hipoxantina, timidina, piruvato de sódio e L-glutamina, micronutrientes e fatores de crescimento (pH 7,3); e solução B contendo lipofectamina 2000 (GIBCO BRL, Grand Island, NY) em meio OPTI-MEM sem soro. A lipofectamina é composta pelo lipídio catiônico 2-3dioleiloxi-N-[2(espermina-carboxamida)etil-]-N,N-dimetil-1-propanaminiun trifluoracetato (DOSPA) e pelo lipídio neutro dioleilol fosfatidiletanolamina (DOPE) na proporção 3:1. A carga positiva e os lipídios neutros do lipossomo podem se complexar ao DNA neutralizando a sua carga negativa. As duas soluções foram misturadas gentilmente e incubadas à temperatura ambiente por 20 minutos para formação do complexo DNA-lipossomo. Enquanto os complexos estavam se formando, as células foram lavadas 1 vez com meio sem soro. À mistura A+B foi adicionado meio OPTI-MEM (para cada placa em sua quantidade específica, ver tabela abaixo) e em seguida esta solução foi adicionada às células. As células foram então incubadas por 24 horas a 37°C. Após este período foi realizada uma diluição 1:3 das células em RPMI mais 5% de SBF. No dia seguinte foi iniciada a seleção dos transfectantes por geneticina (G418, concentração do antibiótico ativo de 1.4 mg/mL) para a transfecção estável. O meio foi trocado a cada 3 dias. Após o período de seleção obtiveram-se os clones de ME-pcDNA3, ME-ST8Sial, TM1.pcDNA3 e TM1.ST8.

Já na transfecção transiente em TM1, não ocorre a seleção pelo G418 e subsequente clonagem dos transfectantes, sendo as células replicadas 1:5, e submetidas ao ensaio citometria de fluxo para verificar a expressão do transgene e de morte celular por iodeto de propídio ou por

perda do potencial transmitocondrial, usando o fluorocromo JC1 como descrito abaixo.

Placa	Número de células plaqueadas inicialmente	Solução A (DNA (μg) e volume de diluição OPTI-MEM (μL))	Solução B (Lipofectamina (μl) e volume de diluição OPTI-MEM (μL))	Volume final de OPTI-MEM
12 poços	$1,0 \times 10^5$	1,6 μg em 100 μL	4 μL em 100 μL	1 mL
35 mm (cm^2)	$4,0 \times 10^5$	4,0 μg em 250 μL	10 μL em 250 μL	2 mL
60 mm	$1,0 \times 10^6$	8,0 μl em 500 μL	20 μL em 500 μL	5 mL
90 mm	$2,5 \times 10^6$	24 μg em 1,5 mL	60 μL em 1,5 mL	10 mL

3.6. CITOMETRIA DE FLUXO

Nos ensaios de citometria de fluxo foram usadas aproximadamente 10^6 células em 100 μL a 4°C em placas de 96 poços de fundo cônico (NUNC, Naperville, IL). As células foram lavadas com 1% BSA em PBS e incubadas com o anticorpo específico, em concentrações na ordem de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Entre as lavagens as células foram precipitadas por centrifugação a $1500 \times g$ a 4°C . Após as lavagens com 1% BSA em PBS, as células foram incubadas com anticorpos secundários conjugados a fluoresceína (FITC) por 1 hora a 4°C , geralmente em concentrações de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Após lavagens, as células foram fixadas por 15 minutos com 1% paraformaldeído em PBS e analisadas em citômetro de fluxo (FacsCalibur, Becton Dickinson).

3.7. INIBIÇÃO DA GLUCOSILTRANSFERASE ATRAVÉS DE PPPP

As células foram tratadas com d-treo-1-fenil-2-hexadecanoilamino-3-pirrolidino-1-propanol-HCL, ou PPPP⁶⁸ (Matreya, Inc) em uma concentração de 0,25µM. Após 72 horas de tratamento, observamos que inibição completa do acúmulo dos gangliosídios na superfície das células por citometria de fluxo, que então eram usadas nos diferentes ensaios.

3.8. ENSAIO DE ADESÃO

As células ME-pcDNA3, ME-ST8Sial e seus clones foram tripsinizadas e 1,5x10⁶ células foram plaqueadas em garrafas de 25 cm². Estas células receberam um pulso de [6-H³] timidina (Amershan Pharmacia) e permaneceram a 37°C por 18 horas. Placas de 24 poços foram sensibilizadas em fibronectina (1,25 e 5 µg/ml), vitronectina (2,5 µg/mL) e laminina (2,5 e 10 µg/mL) em meio sem soro fetal bovino a 4°C "overnight". No dia seguinte as placas foram bloqueadas com BSA 2% em meio sem soro por 1 hora a 37°C. Enquanto isso as células que receberam o pulso de timidina foram tripsinizadas, contadas e incubadas em meio com soro por 1 hora. Em seguida, as placas foram lavadas com PBS e foram colocadas 105 células em cada poço. As células aderiram por um período de 2 horas a 37°C. Em seguida, as placas foram lavadas com PBS 5 vezes para retirada das células que não aderiram e foi adicionado NaOH 0,5M-SDS1% para solubilizar as células por 30 minutos a 37°C. O lisado foi ressuspendido em

600µL de água destilada e colocadas em tubos de cintilação contendo 5ml de aquasol. Alíquotas de 10^5 células também foram contadas. Também foi medido o número de cpm de 10^5 células para os cálculos posteriores.

$$\text{número de células aderidas} = \frac{(\text{cpm}_{\text{células aderidas}} - \text{cpm}_{\text{controle inespecífica}})}{\text{cpm}_{10^5 \text{ células}}} \times 10^5 \text{ células}$$

3.9. RESPOSTA MIGRATÓRIA INDUZIDA POR LAMININA (“TRANSWELLS”)

A migração das linhagens celulares em laminina foi quantificada através de ensaio de migração em “Transwells” (Costar, Corning, NY). “Transwells” são insertos contendo membranas de policarbonato que separam dois compartimentos. As membranas de policarbonato foram sensibilizadas com laminina-1 (10µg/ml por 2 horas a 37°C) em meio de cultura sem soro fetal bovino. Laminina-1, obtida por purificação de extratos do tumor de Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) pelo grupo de Biologia Celular e Molecular do Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer, São Paulo, foi gentilmente cedida pela Dra. Vilma R. Martins. A migração foi avaliada em períodos de tempo que variam de 1 a 3 horas. Após o período de migração as membranas foram fixadas em formaldeído 3,7% em PBS. Em seguida as células foram coradas com azul de toluidina 1% em borax 1%, as células que permaneceram na face superior da membrana foram retiradas com hastes de algodão. As células remanescentes correspondem às células migratórias. Os ensaios foram feitos em duplicatas. Para a quantificação da

migração 10 campos diferentes e aleatórios de cada poço foram contados em objetiva de 40 vezes em microscópio invertido, cuja ocular apresenta um gradil, útil na orientação durante o processo de contagem na objetiva.

Este ensaio foi utilizado seguindo diferentes tratamentos das linhagens celulares estudadas (ME-pcDNA3, ME-ST8Sial e seus clones, ME-ST8D4 e ME-ST8D16) como:

1. anticorpo anti-G_{D3} (R24), do anticorpo anti-G_{M3} (GMR6) (concentração 50 µg/ml) ou na ausência de anticorpo.
2. β-Ciclodextrina⁶⁵ (Sigma, St. Louis, MO) (faz a depleção de colesterol da superfície celular) nas concentrações de 2 mM e 10 mM.
3. G_{D3} (Sigma, St. Louis, MO) exógeno nas concentrações 5µM e 20µM.
4. G_{M3} (Sigma, St. Louis, MO) exógeno na concentração de 10µM.

3.10. MIGRAÇÃO CELULAR (“SCRAPE ASSAY”) ³⁰ E IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA

Esta metodologia foi utilizada para se avaliar a distribuição das moléculas de G_{D3} e β1-integrina nas células ME-pcDNA3 e ME-ST8Sial; e SK-MEL28 no estado não estacionário. Sobre lamínulas redondas (Deckglaser, Germany) colocadas em placas de 24 poços foram plaqueadas 3×10^4 células em meio RPMI 5% de soro e 200 nM de PMA. Após 2 dias (tempo onde as células atingiam a confluência), um risco foi feito nas lamínulas utilizando-se o fundo de um “ependorf”, a fim de se abrir uma superfície livre para que as células pudessem migrar. Após 24 horas de

migração as células foram submetidas à dupla marcação com os anticorpos anti-G_{D3} (R24), ou com o anticorpo anti-9-O-acetil-G_{D3} (Jones, Sigma, St. Louis, MO) e com o anticorpo anti-β1-integrina (anti-FNR) por 1 hora para ME-pcDNA3 e ME-ST8Sial e o anticorpo anti-CD9 (Sigma, St. Louis, MO) para SK-MEL28. Posteriormente as células foram lavadas com PBS 2% de albumina 5 minutos 3 vezes a 4°C, neste momento as células foram fixadas usando paraformaldeído por 15 minutos. As células foram incubadas com os anticorpos secundários anti-rato TRITC e Anti-Ig de camundongo FITC por 1 hora para ME-pcDNA3 e ME-ST8Sial e Anti-Ig de camundongo TRITC para SK-MEL28. As células foram então novamente lavadas como anteriormente e montadas em glicerol 87% ou Entellan (Merck, Darmstadt, Alemanha) sobre lâmina para ser analisada por microscopia de epifluorescência (Nikon E600). Alternativamente, as imagens foram analisadas por microscopia confocal, usando-se o sistema confocal BioRad 1024-UV, acoplado ao microscópio Zeiss Axiovert 100, do Centro de Microscopia Eletrônica (CeME) da Universidade Federal de São Paulo, sob responsabilidade do Prof. Dr. Renato Mortara.

3.11. IMUNOPRECIPITAÇÃO

As células de uma garrafa de 75 cm² em crescimento logarítmico (70-80% de confluência) foram marcadas com 100 μCi metionina radioativa (³⁵S) em meio com soro fetal bovino. Elas foram mantidas em estufa de CO₂ a 37°C por 18 horas. Estas células foram submetidas à lise (0,1M Tris pH 7,5;

150mM NaCl; 1% Triton X-100; 0,1% NaN₃; 10mM NaH₂PO₄ 1mM; EDTA; coquetel de inibidores de proteases) usando 1mL de tampão acima citado. Este lisado foi incubado por 30 minutos no gelo (4°C) e posteriormente centrifuga-se o material por 15 minutos a 10.000xg a 4°C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e realizado o clareamento do material com um soro normal de anti-coelho (diluição de 1:400). Este anticorpo foi incubado por 1 hora a 4°C sob agitação. Foi, então adicionada proteína A-Sepharose (10%v/v em tampão de lise) a esta solução que foi incubado por 1 hora a 4°C sob agitação. Centrifuga-se a 10.000xg por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado e incubado com o anticorpo específico (β_1 e β_3 -integrinas- anti-FNR e anti-VNR respectivamente) por 1 hora a 4°C sob agitação. Foi adicionada proteína A sepharose como descrito acima e incubado por 1 hora a 4°C sob agitação. A amostra foi centrifugada a 10.000xg por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado e guardado em freezer -20°C e o precipitado (proteína A Sepharose) foi lavada 3 vezes em tampão de lise gelado contendo NaCl 0,5M. Este pellet foi ressuspendido em 50 μ L de tampão de proteína redutor e analisado por eletroforese em gel de poliacrilamida SDS. Após seco, procedeu-se a autoradiografia do gel³.

3.12. EXTRATO LIPÍDICO

As células transfectadas foram lisadas em clorofórmio, metanol (extrações sucessivas usando-se soluções 2:1, 1:1 e 1:2 (v:v) de clorofórmio e metanol, respectivamente) com o objetivo de extraírem-se os lipídios

celulares. Os sobrenadantes das 3 extrações foram combinados e o material foi seco à vácuo em centrífuga (“Speed-Vac”, Savant Instruments Inc, Farmingdale, NY). O resíduo foi suspenso em clorofórmio-metanol-água (4:8:3, v/v/v) e então submetidos à partição adicionando-se 0,173 volumes de água (alterando então a relação para 4:8:5,6 v/v/v). A fase inferior foi re-extraída com a fase superior teórica, e as fases superiores foram combinadas, secas e ressuspensas em 50% metanol para posterior análise em ensaio de ELISA.

3.13. ENSAIO DE ELISA

Os extratos lipídicos (15 μ L em 450 μ l de MeOH 50%) foram distribuídos, em triplicata, em placas de ELISA de 96 poços. Este material foi deixado 15 horas adsorvendo na placa. Posteriormente a placa foi lavada (2x) com PBS/BSA 2% de 1 minuto e feito o bloqueio com a mesma solução por 2 horas à temperatura ambiente. Foram realizadas mais 3 lavagens com BSA/PBS 2% antes da incubação com o anticorpo específico (Jones, DH2, R24 e controle (sem anticorpo)). Após este período foram feitas mais 3 lavagem com PBS/BSA 2% e posteriormente a incubação com o anticorpo secundário (Anti- Ig de camundongo conjugado à peroxidase). Realizadas novas lavagens (3x), a reação foi revelada com OPD diluído em tampão fosfato/citrato pH 5,5 na presença 0,05% de H₂O₂. Para bloquear a reação foi utilizado H₂SO₄ 2M. Posteriormente foi procedida a leitura no aparelho de ELISA no comprimento de onda de 482 nm.

3.14. MORTE CELULAR

3.14.1. Tratamento de TM1 com G_{D3} Exógeno e/ou Estaurosporina

As células TM1 ($1,0 \times 10^5$ células) foram plaqueadas em placas de 35 mm ou placas de 6 poços em RPMI-1640 (Sigma, St. Louis, MO), pH 6.9 com 5% de soro fetal bovino (Gibco BRL, Gaithersburg, MD). Após a adesão foi trocado o meio completo para meio com deprivação de soro (RPMI pH 6.9 com 0,5% de soro fetal bovino) por um “overnight”. A ausência do soro facilita a internalização do G_{D3} exógeno. Ainda em condições de ausência do soro é feita a incubação de G_{D3} exógeno ($5\mu\text{g/ml}$ e $20\mu\text{g/mL}$) por 30' a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO₂. Para induzir a morte celular, as células foram incubadas com estaurosporina (5nM, 25nM, 50nM e 250nM) ou G418 ($1,4\text{ mg/mL}$) em meio completo (RPMI pH 6.9 com 5% de soro fetal bovino). É importante ressaltar que não foram retirados os gangliosídeos. A estaurosporina inicialmente foi incubada por 2, 4, 6 e 8 horas. E posteriormente utilizou-se basicamente o tempo de 4 horas de incubação com estaurosporina. Após este período as células foram devidamente processadas dependendo do tipo de análise a ser feita.

3.14.2. Iodeto de Propídio

Foram plaqueadas 10^5 células em placas de 35 mm de diâmetro. As células foram mantidas sob condições de cultura, tripsinizadas e colocadas em tubos de 1,5 ml em 1ml de etanol a 70% para permeabilização e

preparação da fração nuclear, que é a efetivamente analisada nestes ensaios, por pelo menos 2 horas ou por até 20 dias a -20°C . As células foram lavadas 2x com PBS e ressuspendidas em 200 μL de uma solução de iodeto de propídio, como segue: 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ RNase A, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de iodeto de propídio, 0,1% v:v de Triton X-100 (Sigma, St. Louis, MO), em PBS 1x. Em seguida foram incubadas por 30 minutos, protegidas da luz. Após esse período, as células foram analisadas em citômetro de fluxo. Foram analisadas 10000 a 15000 eventos por amostra. O conteúdo de DNA foi avaliado pela fluorescência vermelha (610nm), captada nos fotomultiplicadores FL2 e/ou FL3.

3.14.3. JC1

Foram colocadas 10^6 células em placas de 35mm diâmetro e após as células aderirem (cerca de 2 horas), foram incubadas com 250nM de estaurosporina por 8 a 15 horas. O sobrenadante e as células aderidas foram retirados e ressuspendidas em meio de cultura suplementado com 10% de SBF. Adicionou-se 200nM de JC-1 (5, 5', 6, 6'-tetracloro-1, 1', 3, 3'-tetraetil-bensimidazolilcarbocianino iodido) ¹⁰¹ e em seguida agitou-se intensamente por 20 segundos, e então as células foram lavadas 2x com PBS. Elas foram incubadas por 15 minutos em PBS e temperatura 25°C . A morte celular foi avaliada no citômetro de fluxo, a 488nm.

JC₁ é um fluorocromo catiônico que se difunde livremente para o interior da célula e se acumula dentro da mitocôndria, dependendo de seu potencial de membrana. Sua concentração no interior da mitocôndria está

associada à formação de agregados de JC₁. Enquanto monômero, JC₁ emite fluorescência verde. Agregados de JC₁ emitem fluorescência vermelha quando as células são excitadas com luz azul (488nm). Esta propriedade permite estimar a frequência de células cujo potencial transmembranal ($\Delta\Psi_m$) foi dissipado. A despolarização da membrana da mitocôndria é um dos eventos iniciais da apoptose. JC₁ emite fluorescência verde (525nm) e vermelha (590nm). A despolarização da mitocôndria é indicada pela diminuição da razão da intensidade da fluorescência vermelha/verde. Assim, após a aquisição das células no citômetro de fluxo, e avaliação com o software Cell Quest.

3.15. ANÁLISE DA EXPRESSÃO DAS ENZIMAS G_{D3} SINTASE E G_{M2}/G_{D2} SINTASE POR RT-PCR:

3.15.1. Extração de RNA Total

As células, ME-pcDNA3, ME-ST8D4, TM1, TM1.pcDNA3, TM1.ST8 e B16-F10, foram lavadas 3 vezes em PBS. Após a retirada total do PBS, adicionou-se 1 mL de reagente de trizol (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD). O reagente de trizol é uma solução monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina que torna mais eficiente à extração de RNA de células e tecidos. Assim que as células se soltaram, foram transferidas para tubos de microcentrífuga, onde ficaram homogeneizando por 5 minutos a temperatura ambiente. Adicionou-se 200 μ L de clorofórmio, homogeneizou-se por inversão e incubou-se a temperatura ambiente por 2 minutos. Em seguida

centrifugou-se a 12000xg por 15 minutos a 4°C. Após centrifugação observaram-se 3 fases: a fase aquosa, onde se encontra o RNA, a interface, que contém proteínas e DNA e a fase com fenol clorofórmio. Transferiu-se a fase aquosa para um novo tubo e adicionou-se 500 µl de álcool isopropílico para precipitar o RNA. Os tubos foram então incubados por 16 horas a -20°C. Após este período, centrifugou-se os tubos a 11000xg por 10 minutos a 4°C, lavou-se o pellet com etanol 75%, e centrifugou-se a 7500xg por 5 minutos a 4°C. As amostras foram então dissolvidas em água DEPEC (água tratada com o inibidor de RNase, dietilpirocarbonato - MERCK) e incubadas por 10 minutos a 60°C para permitir a completa dissolução do RNA. A concentração das amostras foi determinada por espectrofotometria (medida da absorbância a 260 e 280 nm) e a integridade do RNA foi confirmada em gel de agarose 1% em tampão MOPS (MOPS 20 mM, EDTA 1 mM, Acetato de sódio 5mM).

3.15.2. Tratamento do RNA com DNase

A 10 µg de RNA foi acrescentado TE para um volume final de 50 µl. A seguir acrescentou-se 50 µL da solução para DNase (10 mM de MgCl₂/DTT, 1 U/µl de DNase I, 60% (v/v) de TE pH 7.4) e incubou-se a 37 °C por 30 minutos. Adicionou-se então 2 µl de proteinase K (2 mg/mL) e incubou-se a 37 °C por 30 minutos. Adicionou-se 50 µl de uma solução de inativação da DNase (0.5 M de EDTA, 3 M de acetato de sódio e 20% (v/v) de SDS) e 125 µL de água DEPC. Adicionou-se 250 µl de fenol:clorofórmio (1:1), pH 4.5 -5.5, misturou-se por inversão e centrifugou-se a 12000 xg por 15 minutos.

Transferiu-se a fase aquosa para um novo tubo e adicionou-se NaCl para uma concentração de 250mM final. Adicionou-se 500 μ L de isopropanol para a precipitação. Incubou-se a -20°C por 30 minutos. Centrifugou-se a 12000xg por 15 minutos e descartou-se o sobrenadante. Lavou-se o precipitado com etanol 75% 2x e centrifugou-se a 12000xg por 5 minutos. Descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se em 10 a 20 μ L de água DEPC.

3.15.3. Síntese de cDNA

A 10 μ L de RNA acrescentou-se 1 μ L de oligo dT 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Invitrogen, Carlsbad, CA), 1 μ L de dNTP 0.5 mM (Invitrogen, Carlsbad, CA) e água DEPEC. Aqueceu-se a 65°C por 5 minutos e esfriou-se rapidamente em gelo. A seguir fez-se uma breve centrifugação e adicionou-se tampão 1 μ L de “first-strand” 1x (Invitrogen, Carlsbad, CA) 1 μ L de DTT 0.1 M (Invitrogen, Carlsbad, CA). Misturou-se gentilmente e incubou-se a 42°C por 2 minutos. Adicionou-se então 200 U de “superscript II” (Invitrogen, Carlsbad, CA) e misturou-se vagorosamente. Incubou-se por 50 minutos a 42°C . A reação foi inativada aquecendo-se os tubos a 70°C por 15 minutos. Estocou-se o cDNA sintetizado a -20C° até o momento do uso.

3.15.4. Reação de RT-PCR

A reação PCR foi realizada em um volume final de 20 μ l contendo tampão de PCR 1x (Invitrogen, Carlsbad, CA); 1.5 mM de MgCl_2 (Invitrogen, Carlsbad, CA); 200 μM de dNTPs (Invitrogen); 0.3 μM de cada iniciador e 1 U/ \square L de Taq (Invitrogen, Carlsbad, CA). As condições de PCR foram as

seguintes: 35 ciclos de 95°C por 5 minutos, 95°C por 1 minuto, 56°C por 1 minuto, 72°C por 15 minutos e 72°C por 10 minutos. Em seguida, as amostras foram corridas em um gel de agarose 1,7% em TBE (Tris 90 mM, ácido bórico 90 mM, EDTA 50 mM, pH 8.0) acrescido de brometo de etídio. Foram utilizados os seguintes iniciadores: L 5'-CCA GCC CAG TTC TGG ATA AA-3' e R 5'-GAG CCG TGA TGA CAG ACA GA-3' para a G_{M2}/G_{D2} sintase de camundongo, L 5'-AGC GTT CAG GAA ACA AAT GG-3' e R 5'-GCC GAA TTA TGC TGG GAT TA-3' para G_{D3} sintase humana e L 5'-CTG GGT CAT CTT TTA ACG GT-3' e R5'-TGT TAC CAA CTG GGA CGA CA-3' para a β -actina de camundongo.

Os iniciadores foram desenhados utilizando-se o programa Primer 3 disponível na "homepage" http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3.cgi/results_from_primer3. E posteriormente avaliada a homologia para outros genes no BLASTn <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>. Os iniciadores que se mostraram específicos pela análise *in silico* foram então adquiridos (Invitrogen) e utilizados nos ensaios como descrito acima.

3.16 CURVA DE PROLIFERAÇÃO DOS TRANSFECTANTES DE TM1

Para avaliar o crescimento dos transfectantes de TM1 realizou-se uma curva de crescimento. Os transfectantes TM1.pcDNA3 e dois transfectantes independentes de G_{D3} sintase, TM1.ST8(1) e TM1.ST8(2),

foram plaqueados em triplicatas em placas de 6 poços (60mm) (5×10^4 células/poço). As células foram mantidas em condições de cultivo e após cada período (24, 48, 72, 96 e 120 horas) foram contadas, utilizando uma ocular que apresenta um gradil, útil na orientação durante o processo de contagem nas objetivas (10x ou 20x). Foram contados 10 campos diferentes e aleatórios por monoplicatas e feita a média por número de células em microscópio invertido. Para a montagem das curvas de crescimento foram utilizadas as médias de cada triplicata (mais seu respectivo desvio padrão) dos diferentes transfectantes em diferentes dias.

3.17. ENSAIO DE TRANSPLANTABILIDADE DOS TRANSFECTANTES DE TM1 EM CAMUNDONGOS C57/BL-6

Para avaliar a tumorigenicidade das células TM1 transfectadas, 5×10^4 células de cada transfectantes foram injetadas no subcutâneo do flanco esquerdo em cinco camundongos C57/bl-6. Os animais foram mantidos no biotério da Faculdade de Medicina da USP sem restrições alimentares com ciclo de luz de 12 horas. A partir do 12^o dia, os camundogos foram observados diariamente para acompanhar o aparecimento de tumores. Os animais foram sacrificados quando os tumores ultrapassaram volumes equivalentes a 1cm^3 com o objetivo de minimizar o seu sofrimento. As curvas de aparecimento foram analisadas comparativamente nos diferentes transfectantes.

3.18. ANÁLISE DO GENE *TP53* NAS LINHAGENS CELULARES UTILIZADAS

3.18.1. Extração de DNA

Para extração do DNA genômico foi extraído o DNA das linhagens celulares analisadas, a partir de um pellet de células contendo 6×10^6 células/ml. Este pellet de células foi submetido à extração de DNA utilizando o DNAzol (Gibco, Gaithersburg, MD). A concentração do DNA foi determinada pela leitura da absorbância a 260nm, onde 1 unidade OD₂₆₀ em cubeta cujo passo de luz (espessura) é de 1 cm equivale a uma concentração de 50 µg/mL de DNA e o grau de pureza foram determinados pela relação das medidas de absorbância a 260/280 nm.

3.18.2. Iniciadores

Os oligonucleotídeos utilizados como iniciadores flanqueiam regiões intrônicas ou exônicas do gene *TP53* de *Mus musculus* foram sintetizados no Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer, São Paulo: Estes iniciadores estão descritos na tabela abaixo ¹²⁰.

Estes iniciadores foram padronizados para o sequenciamento direto pelo aparelho ABI PRISM™377 DNA Sequencer da Perkin Elmer.

Exons	Nomes dos iniciadores	Seqüências dos iniciadores	Temperatura de anelamento
5	MP5-49F	5'-ACACCTGATCGTTACTCGGCTTGTC-3'	71°C
	MP4-41R	5'-GGAGGAGCCAGGCCTAAGAGCAA-3'	
6	MP6-40F	5'-CACCATGAGCGCTGCTCCGATGG-3'	70°C
	MP6-50R	5'-GCTAGAAAGTCAACATCAGTCTAGG-3'	
7	MP7-56F	5'-CAGGTACCTGTAGTGAGGTAGGG-3'	71°C
	MP7-57R	5'-TGGAACAGAAACAGGCAGAAGCTGG-3'	
8	MP8-58F	5'-AGTCAGGATGGGGCCCAGCTTTCT-3'	71°C
	MP8-51R	5'-AAGAGTGACTTTGGGGTGAAGCTC-3'	

3.18.3. PCR Específica para Seqüenciamento Direto

Nas reações de PCR, 50 ng de DNA genômico foram amplificados na presença de 20 pmoles de cada iniciador, 200 μ M de cada um dos desoxiribonucleotídeos trifosfatos, MgCl₂ 1,5 mM, KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM pH 8,3,(tampão da PCR) e 1,0 U de Taq DNA Polimerase (Gibco-BRL, Gaitherburg, MD) em volume final de 25 μ L. A reação de amplificação incluiu um ciclo inicial de desnaturação a 95°C por 5 min, seguido por 42 ciclos de amplificação, consistindo de 1 min a 95°C, 1 min na temperatura de pareamento e 1 min a 72°C, finalizando com 1 ciclo de extensão de 5 min a 72°C em aparelho com ciclos de temperatura automatizada. As temperaturas de pareamento estão descritas na literatura ¹²⁰.

3.18.4. Seqüenciamento Direto

Após a amplificação do DNA genômico por uma PCR específica, 1 μ l deste produto foi utilizado para a reação de seqüência com o kit ABI PRISM™ Big Dye™ terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin Elmer). A reação de seqüenciamento inclui um ciclo inicial de desnaturação

a 96°C por 5 min., seguido por 25 ciclos de amplificação, consistindo de 30 seg a 96°C, 15 seg a 55°C e 4 min. a 60°C em aparelho com ciclos de temperatura automatizada. O produto foi precipitado utilizando isopropanol 60%, centrifugado por 20 min a 14000 rpm, o sobrenadante foi desprezado e o "pellet" lavado duas vezes com ETOH 70%. O "pellet" seco é ressuspenso em tampão desnaturante (95% formamida, 5% blue dextran), aquecido a 95°C por 3min e o material aplicado em gel de poliacrilamida desnaturante (Long Ranger™ Gel Protocols - FMC®) e utilizando o sequenciador ABI PRISM™377 DNA Sequencer (Perkin Elmer). Em alguns casos foi necessário purificar o produto de PCR utilizando o Kit.

4.RESULTADOS

4.1. OBTENÇÃO DOS TRANSFECTANTES DE MELAN-A

A linhagem de melanócitos murinos melan-a foi usada em nosso laboratório para transfecção heteróloga com o gene humano da sialiltransferase G_{D3} *sintase*. Esta enzima converte o monosialogangliosídeo G_{M3} no dissialogangliosídeo G_{D3} . O gangliosídeo G_{D3} pode sofrer modificações de O-acetilação, originando, mais freqüentemente, o seu derivado 9-O-acetil G_{D3} . A transfecção foi realizada utilizando o plasmídeo pcDNA-3 que possui uma expressão adequada em células eucarióticas. Este plasmídeo apresenta o promotor do citomegalovírus (que controla a transcrição da sialiltransferase) e ainda apresenta o gene neo^R , que confere resistência a geneticina, utilizado como marcador para seleção. As células transfectadas com o plasmídeo contendo a sialiltransferase originaram os clones ME-ST8Sial e seus derivados (ME-ST8D4 e ME-ST8D16) e as células transfectadas com os plasmídeos vazios (controle) originaram ME-pcDNA3 (Figura 4).

A análise de expressão de gangliosídios na superfície celular foi verificada através de citometria de fluxo (Figura 5). ME-ST8Sial passou a expressar G_{D3} e seu derivado 9-O-acetil- G_{D3} em sua superfície celular enquanto ME-pcDNA3 não (Figuras 4 e 5). Porém ambas linhagens expressam G_{M3} , mas em quantidades diferentes. Em ME-ST8Sial ocorreu

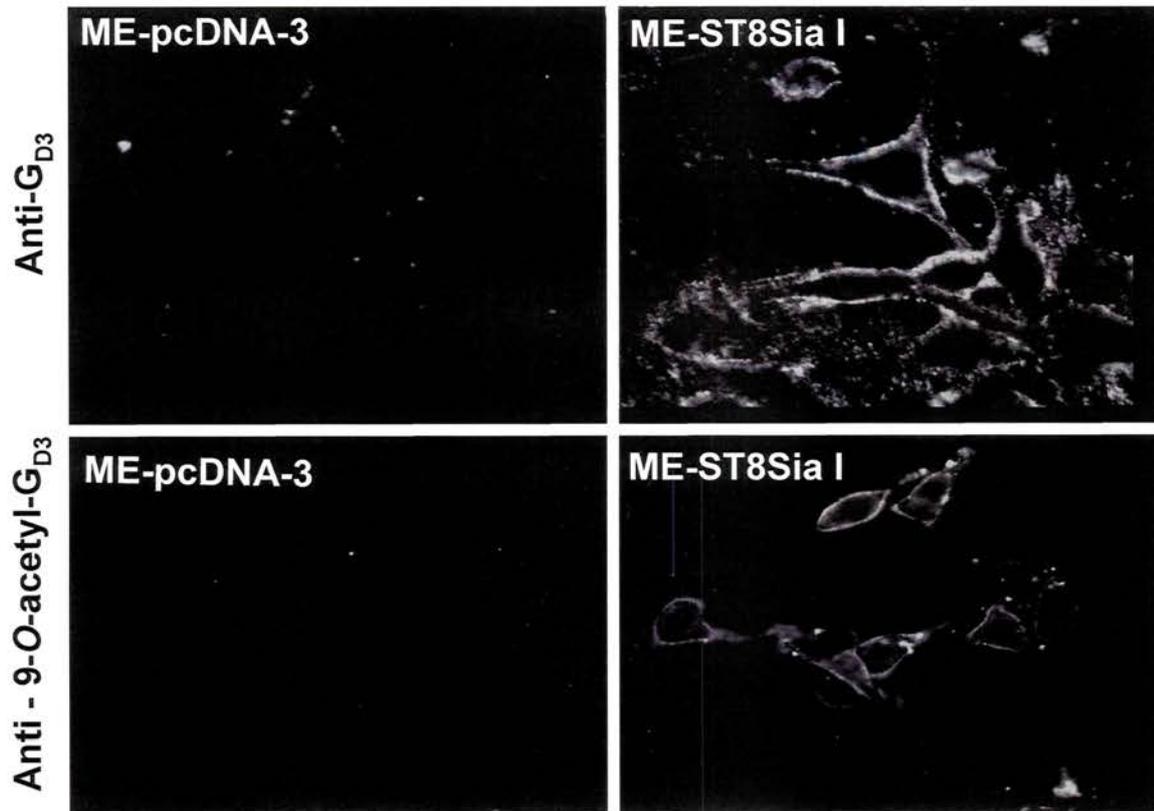


Figura 4: Obtenção dos transfectantes de melan-a. Para controle as células melan-a foram transfectadas com o plasmídeo (pcDNA-3) vazio (painéis da esquerda). Após a transfecção, as células controle não expressam G_{D3} (painel superior esquerdo) ou 9-O-acetil- G_{D3} (painel inferior esquerdo). Nos painéis à direita as células melan-a foram transfectadas com o plasmídeo contendo o gene da G_{D3} sintase (ST8Sia I) e após seleção as células mostraram-se positivas para G_{D3} e 9-O-acetil- G_{D3} , nas quais podemos observar um padrão de marcação na superfície celular e em estruturas do tipo vesiculares no citoplasma (lisossomos?). Os transfectantes foram avaliados através da imunofluorescência indireta em células permeabilizadas e em estado estacionário utilizando os anticorpos adequados.

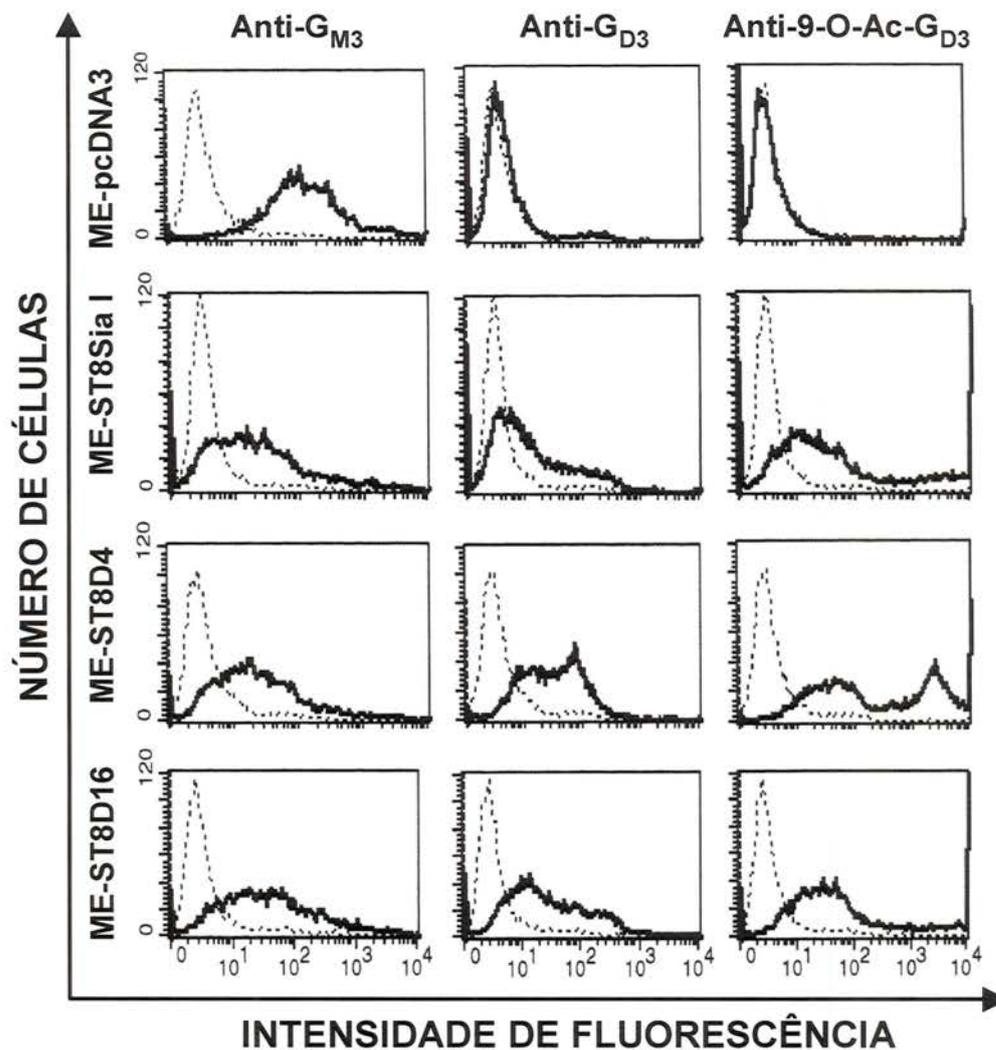


Figura 5: Expressão dos dissialogangliosídeos nas células transfetadas. Obtenção dos transfectantes de melan-a: ME-pcDNA3, ME-ST8Sial, ME-ST8D4, ME-ST8D16; as células transfetadas com a enzima ST8Sia I passaram a expressar dissialogangliosídeos (G_{D3} e 9-O-acetil- G_{D3}) em sua superfície celular. As células ME-ST8Sia I, mas não as células ME-pcDNA-3, expressam tanto G_{D3} como 9-O-acetyl- G_{D3} em sua superfície celular. As linhas pontilhadas representam o controle negativo da reação; linhas grossas, a imunomarcação com anticorpo específicos.

uma diminuição do nível de expressão de G_{M3} na superfície celular (Figura 5). Foram feitas tentativas de subclonagem de ME-ST8Sial. Inicialmente, não obtivemos sucesso usando a técnica de clonagem por diluição limitante. Aparentemente as células ME-ST8Sial parecem ser muito sensíveis ao crescimento em baixa densidade, o que poderia ser devido à presença de G_{D3} e 9-O-acetil G_{D3} . A partir desta observação, fizemos subculturas plaqueando as células MEST8Sial em diferentes densidades. Em condições habituais de cultura, o inóculo usado no repique das células é de cerca de 4×10^5 cel/cm². As células MEST8Sial foram cultivadas a partir de inóculos de 2×10^5 cel/cm², 10^5 cel/cm², 5×10^4 cel/cm², $2,5 \times 10^4$ cel/cm² e $1,25 \times 10^4$ cel/cm²; respectivamente 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 do inóculo inicial. A partir das células cultivadas nas densidades 1:4 e 1:16 individualizaram-se dois clones de células que foram isolados e propagados em cultura, originando os clones ME-ST8D4 e ME-ST8D16 que expressam G_{D3} e 9-O-acetil- G_{D3} em diferentes níveis em sua superfície celular (Figura 5).

4.2. AVALIAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO SUBCELULAR DE DISSIALOGLANGLIOSÍDIOS

Através de imunofluorescência indireta avaliamos a distribuição subcelular dos gangliosídeos em relação a β_1 -integrinas nas células ME-ST8Sial. G_{M3} , G_{D3} e 9-O-acetil- G_{D3} foram encontrados na membrana plasmática destas células formando “clusters” em compartimentos (projeções) da membrana plasmática como lamelipódios, filopódios, neuritos

e uropódio co-localizando ou não com β_1 -integrinas (Figuras 6, 7, 8 e 9). A análise do estado estacionário vs. dinâmico de uma célula é de extrema importância quando o objetivo é a avaliação da simetria das moléculas envolvidas na migração.

O estado migratório das células ME-pcDNA3 e ME-ST8Sial foi avaliado através do ensaio “scrape assay”³⁰. Neste ensaio, as células foram plaqueadas sobre lamínulas redondas de 13 mm de diâmetro e após as células atingirem confluência, foi feito um risco na lamínula para se abrir uma superfície para onde as células são estimuladas a migrar. As células foram somente fixadas posteriormente à incubação com os anticorpos primários, assim evita-se a permeabilização da célula quando da incubação com os anticorpos primários. Avaliaram-se assim células ME-pcDNA3 e ME-ST8Sial em atividade migratória. Estas células foram submetidas à dupla-marcação e analisadas por microscopia confocal. As células foram incubadas com anticorpos anti-gangliosídios (anti- G_{D3} (R24) ou 9-O-acetil- G_{D3} (Jones)) e anti- β_1 -integrina, e subsequentemente incubadas com anti-IgG de camundongo e coelho respectivamente marcados com rodamina (vermelho) ou isotiocianato de fluoresceína (verde), como anticorpos secundários. Nas Figuras 6,8 e 9, a cor vermelha indica presença de G_{D3} ou 9-O-acetil- G_{D3} na membrana, a cor verde indica presença de β_1 -integrina e a co-localização é evidenciada em alaranjado (Figura 6, 8 e 9).

Nas células ME-ST8Sial estimuladas a migrarem a distribuição topográfica de 9-O-acetil- G_{D3} ou G_{D3} em relação à β_1 -integrinas é a mesma. Claramente estas moléculas distribuem-se no plano da membrana, como

mencionado acima. Ainda, também observamos 9-O-acetil-G_{D3} colocalizando com β_1 -integrinas em diferentes regiões especializadas da membrana com o neurito, filopódio e lamelipódios. Quando observamos as células ME-ST8Sial no seu estado migratório, notamos uma segregação de G_{D3} das integrinas no uropódio destas células. β_1 -integrinas não parecem presentes nesta região. Na Figura 9 (inserto), podemos notar um rastro de G_{D3} sendo deixado na matriz, pela célula em migração.

4.3. INIBIÇÃO DA GLUCOSILCERAMIDA SINTASE UTILIZANDO PPPP PARA OS ENSAIOS DE MIGRAÇÃO

Para avaliar o potencial modulador de gangliosídios em relação à migração celular, nós utilizamos um inibidor da glucosilceramida sintase (fenil-palmitoilamino-pirrolidino-propanol, PPPP)⁶⁸, que bloqueia a síntese de glicosfingolipídios e gangliosídios sem alterar os níveis de ceramida celular em células de mamífero, como ocorre com outros inibidores desta enzima, como o PDMP (fenil-decanoilamino-morfolino-propanol). Este fato é relevante em nosso estudo, uma vez que ceramida livre é um produto metabólico que pode agir como segundo mensageiro na transdução de sinais afetando assim o crescimento celular e migração celular⁷³.

Nós padronizamos em células SK-MEL28 o tempo e dose necessária para o tratamento das células que levassem à depleção de gangliosídios, bem como as condições de reversão deste efeito. As células SK-MEL28, uma linhagem estabelecida de melanoma humano, e os transfectantes de

melan-a foram tratadas com PPPP. Para a padronização do tratamento inicialmente usamos as seguintes concentrações de PPPP 2 μ M, 1,5 μ M, 1 μ M, 0,5 μ M, 0,25 μ M e 0. Como utilizamos o solvente etanol absoluto como veículo, nosso controle do tratamento foi constituído das diferentes diluições de etanol que correspondem as diferentes concentrações de PPPP citadas acima: 0,1%, 0,01%, 0,0075%, 0,005%, 0,0025%, 0,00125%. Observamos que com 0,25 μ M já havia inibição de síntese de todos os gangliosídios, como avaliado por citometria de fluxo usando-se os anticorpos Jones, R24 e GMR6 respectivamente anti-G_{D3}, 9-O-acetil-G_{D3} e G_{M3}. Esta concentração foi então escolhida para os demais experimentos. A inibição completa do acúmulo de gangliosídios foi observada após 72 horas de tratamento. Com a remoção do inibidor, observou-se o reaparecimento gradual dos gangliosídios já a partir de 24 horas; a partir de 72 horas após a remoção de PPPP, os níveis de gangliosídios na superfície celular eram equivalentes aos de células não tratadas. Não foram observadas alterações morfológicas nas células tratadas com PPPP.

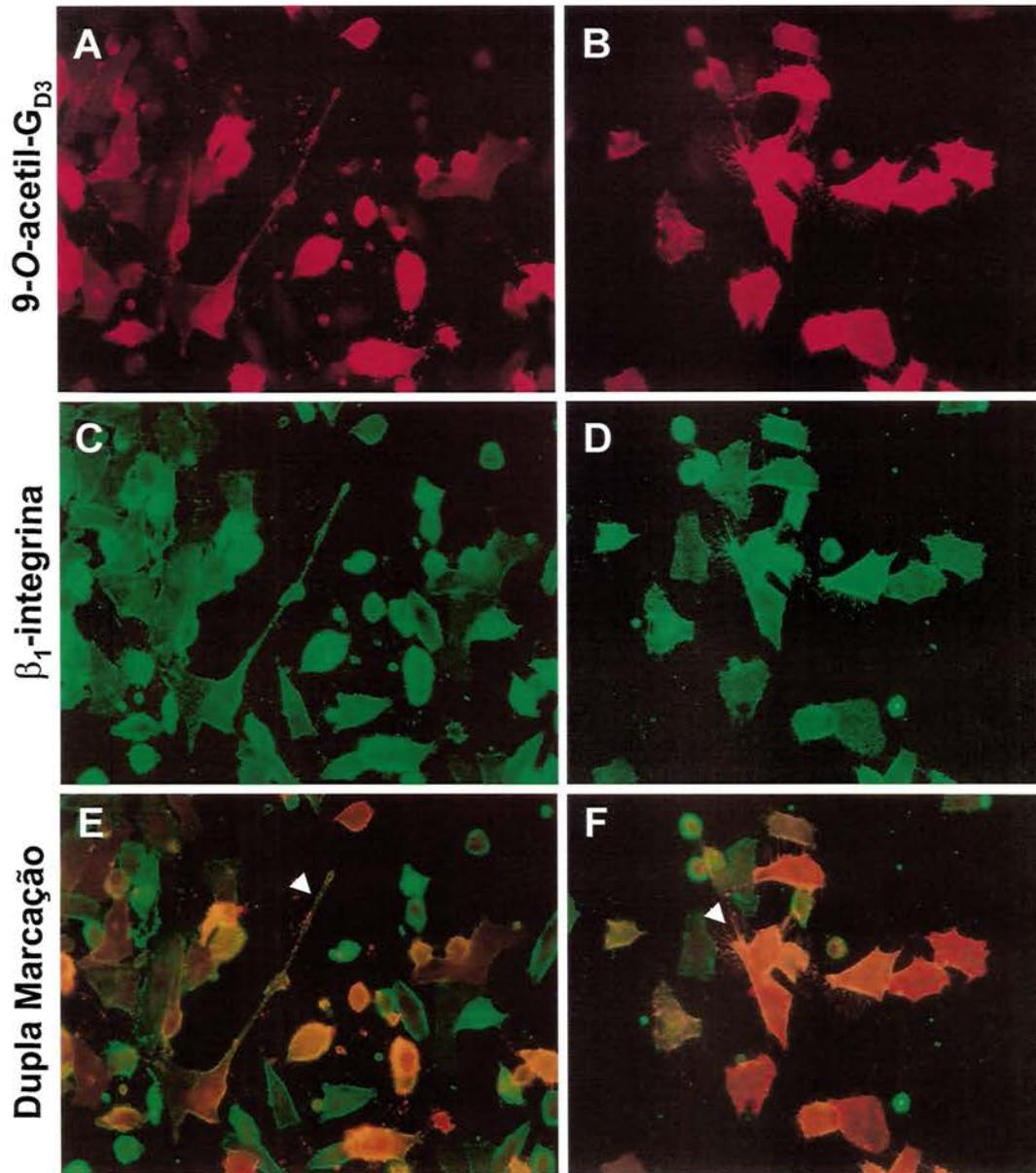


Figura 6: Distribuição dos disialogangliosídeos nas células melan-a transfectantes durante o processo de migração celular. Nós avaliamos como os disialogangliosídeos estão distribuídos na membrana das células migratórias (em oposição a avaliação em estado estacionário mostrado na figura 4). A migração foi avaliada pelo ensaio “scrape assay”. As células migratórias são facilmente visualizadas nas margens do risco feito em células em confluência cultivadas em lamínulas de vidro. Esta abordagem nos permitiu avaliar a polarização das moléculas envolvidas na migração celular utilizando-se microscopia de fluorescência convencional. As células foram analisadas sem serem permeabilizadas. O anticorpo secundário anti-gangliosídeo estava conjugado com rodamina (vermelho), e o anticorpo secundário anti- β_1 integrina a fluoresceína (verde). As regiões de colocação de ambos antígenos são evidenciadas em amarelo/laranja (E-F). β_1 integrina (C-D) e 9-O- acetil-G_{D3} (A-B) foram achados em adesões fibrilares da célula (seta F) e na extremidade de expansões do tipo neurito símile (seta E).

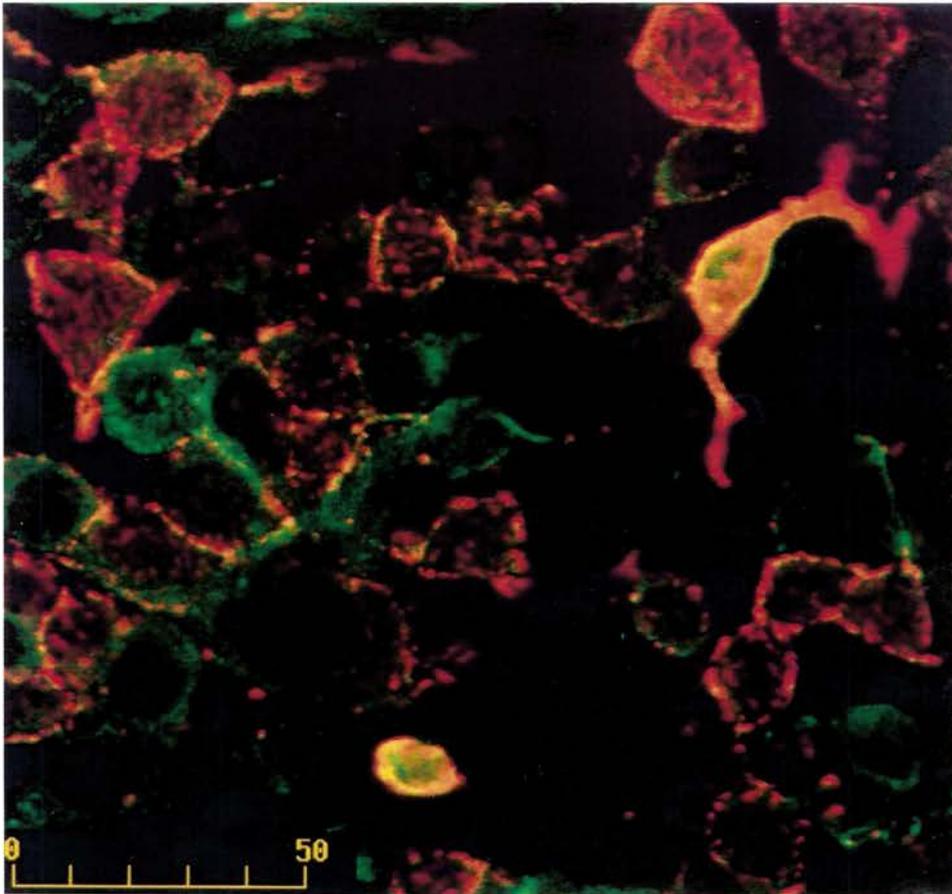


Figura 7: A distribuição de G_{M3} nas células melan-a transfectantes durante o processo de migração celular: avaliação por microscopia confocal. Seguindo o mesmo procedimento descrito na figura 6. As células avaliadas foram imunomarcadas simultaneamente com o anticorpo anti- G_{M3} (GMR6) (vermelho) e anti- β_1 integrina (verde) e revelados com os anticorpos secundários conjugados adequados. A coloração amarelo/laranja indica a colocalização dos dois anticorpos acima citados. O monossialogangliosídeo, G_{M3} , está presente na superfície celular e localiza-se também em expansões celulares associadas à migração e apresenta um padrão de marcação bastante semelhante ao mostrado pelos dissialogangliosídeos (figuras 8 e 9).

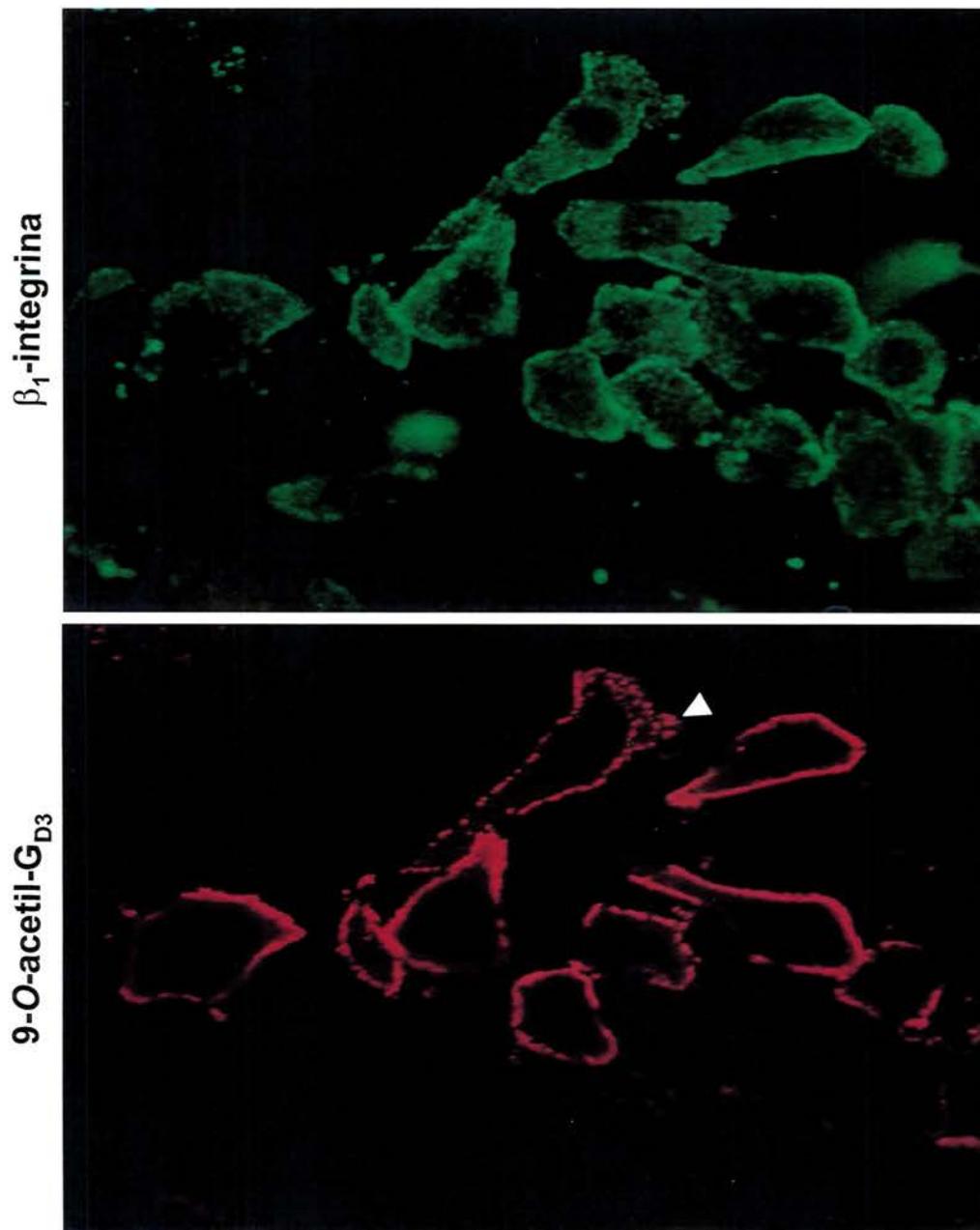


Figura 8: A distribuição dos dissialogangliosídeos nas células melan-a transfectantes durante o processo de migração celular: avaliação por microscopia confocal. Seguindo o mesmo procedimento descrito na figura 6. As células avaliadas foram imunomarcadas simultaneamente com o anticorpo anti-9-O-acetil- G_{D3} (Jones) (abaixo) e anti- β_1 integrina (acima) e reveladas com os anticorpos secundários conjugados adequados. Tanto 9-O-acetil G_{D3} como β_1 integrina foram achados nos mesmos compartimentos, incluindo lamelipódios das células migratórias.

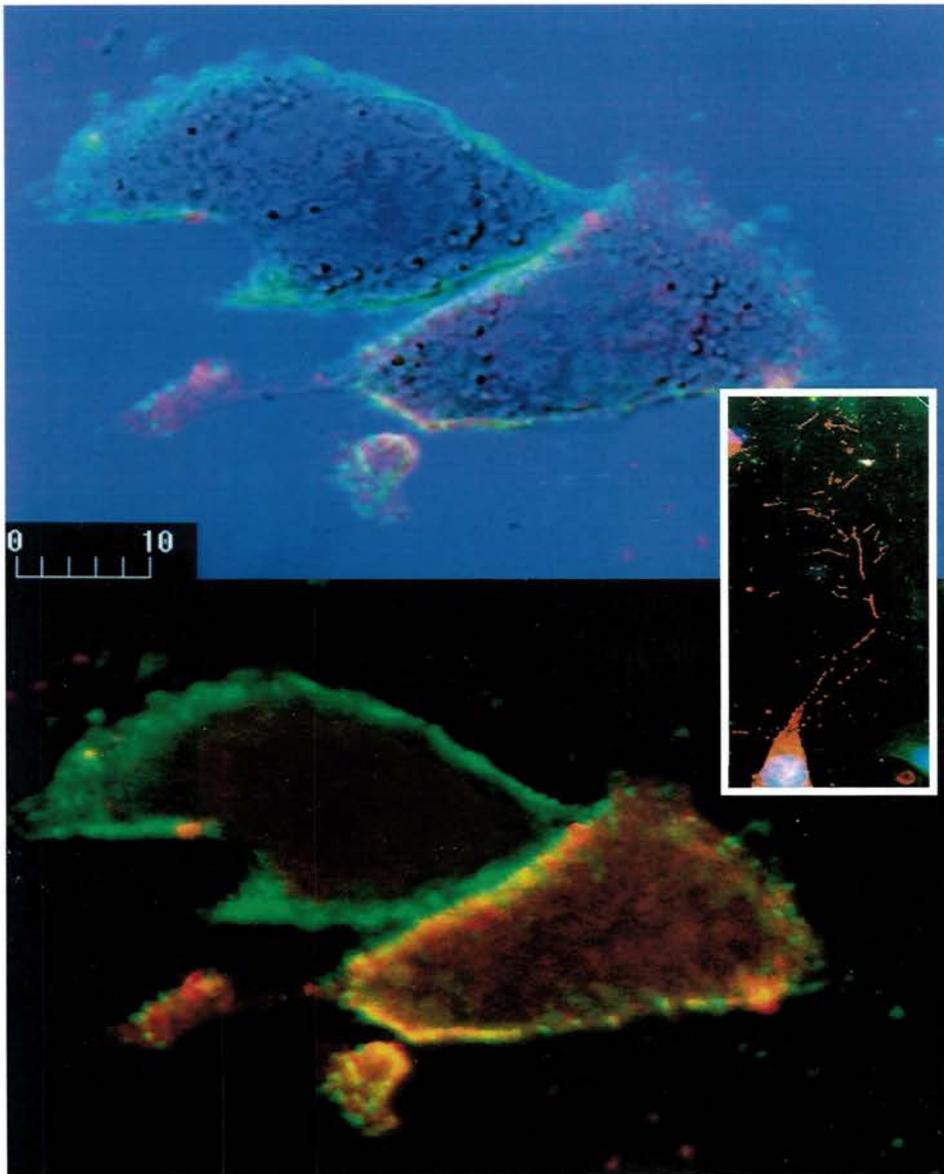


Figura 9: A distribuição dos dissialogangliosídeos nas células melan-a transfectantes durante o processo de migração celular: avaliação por microscopia confocal. Seguindo o mesmo procedimento descrito na figura 6 as células avaliadas foram imunomarcadas simultaneamente com o anticorpo anti-9-O-acetyl- G_{D3} (Jones) e anti- β_1 integrina. As regiões de colocalização de ambos antígenos são evidenciadas em amarelo/laranja. No uropódio da célula migratória observamos a segregação de 9-O-acetyl- G_{D3} de β_1 integrina (acima, mostra a dupla marcação e o contraste de interferência da célula migratória e abaixo, somente a dupla marcação da mesma célula). G_{D3} é deixado na matriz extracelular como um rastro ("footprint") (inserto), enquanto β_1 integrinas são recicladas para o corpo celular.

4.4. AVALIAÇÃO QUALITATIVA E QUANTITATIVA DAS INTEGRINAS NAS DIFERENTES CÉLULAS E CONDIÇÕES DE TRATAMENTO

4.4.1. Nos Transfectantes de melan-a e Clones

ME-pcDNA3 e ME-ST8Sial e seus clones apresentam níveis de expressão similar de β_1 e β_3 integrinas na sua superfície celular avaliados pela citometria de fluxo (Figura 10). Ainda, o perfil avaliado por imunoprecipitação utilizando-se os mesmos anticorpos (integrinas) usados na citometria de fluxo (Figura 11) é essencialmente o mesmo. Assim o modelo aqui apresentado é adequado para avaliar um possível papel modulador dos gangliosídios na função das integrinas. Estes dados sugerem que não há diferença significativa na quantidade e composição das β_1 e β_3 integrinas presentes nos clones gerados neste estudo.

4.4.2. Nos Transfectantes de melan-a e seus Clones Tratados ou não com PPPP

Integrinas são encontradas nos mesmos microdomínios que os glicosfingolipídios sialilados, os gangliosídios, como G_{M3} e G_{D3} ^{55,126}. A avaliação do nível das integrinas nas diferentes células transfectadas foi necessária. Nós observamos que tanto quantitativamente como qualitativamente as integrinas se mostraram bem semelhantes entre os diferentes transfectantes, controle e com a G_{D3} sintase. Nos ensaios utilizando o tratamento com PPPP os níveis da β_1 integrina foram avaliados

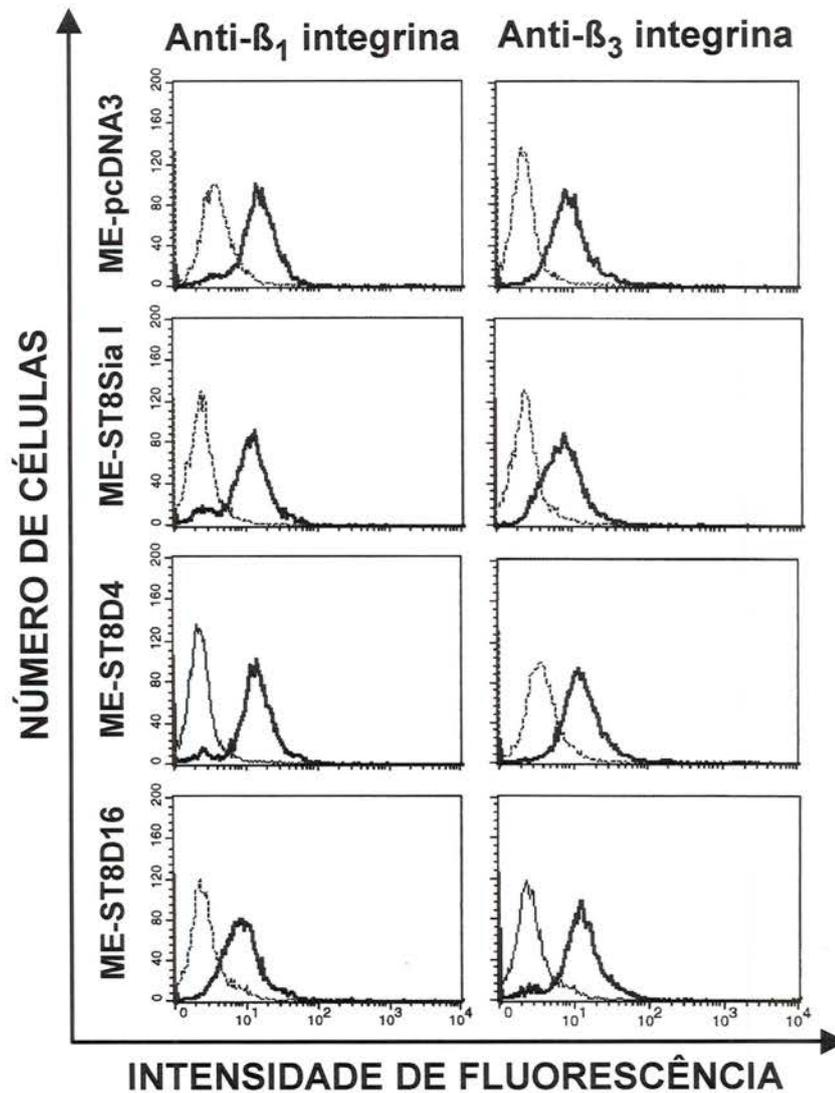


Figura 10: β_1 e β_3 integrinas apresentam o mesmo nível de expressão na superfície de ambas células (Controle e transfectantes). Avaliação por citometria de fluxo dos níveis globais de integrinas contendo as cadeias β_1 e β_3 nos transfectantes derivados de melan-a. Cada histograma representa um transfectante, perfis em linha fina representam os controles negativos de cada reação, enquanto que os perfis em linha grossa mostram a distribuição das células imunomarcadas com os anticorpos específicos. Note que não houve alterações no grau de marcação entre as diferentes linhagens, sugerindo que não existam diferenças quantitativas na expressão de superfície das integrinas estudadas.

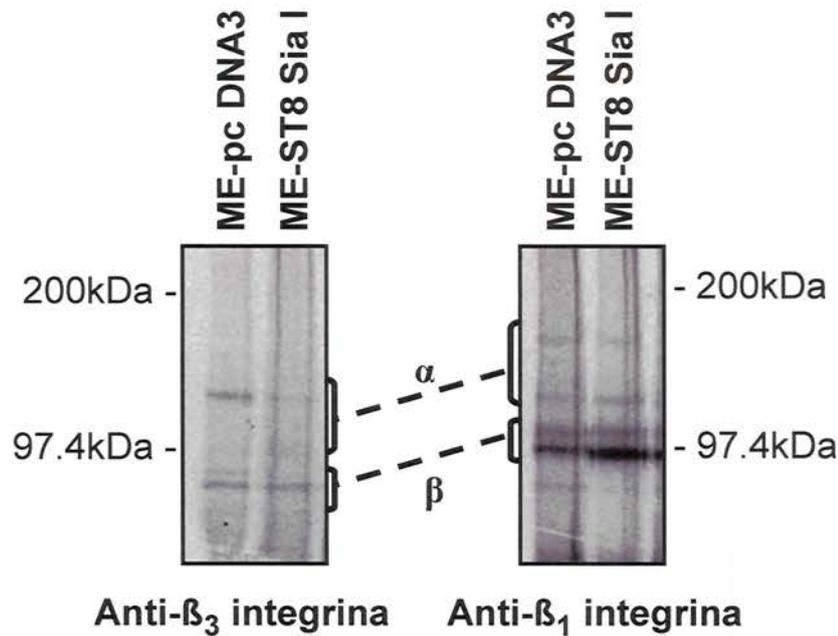


Figura 11: Não houve diferenças qualitativas quanto à composição das integrinas em ME-pcDNA3 e ME-ST8Sial. As células transfectantes foram avaliadas por imunoprecipitação utilizando anticorpos anti-β₃ e anti-β₁ integrinas. As células foram marcadas previamente com [³⁵S]-metionina, o que nos permite avaliar o perfil de bandas imunoprecipitadas de maneira comparativa. O material imunoprecipitado foi então separado em gel de poliacrilamida-SDS, seco e revelado por autorradiografia. As bandas referentes às cadeias α e β estão indicadas. Os perfis dos transfectantes são semelhantes, sugerindo que não houve mudanças nos tipos de integrinas expressas após a transfecção com o gene da *G_{D3}-sintase*.

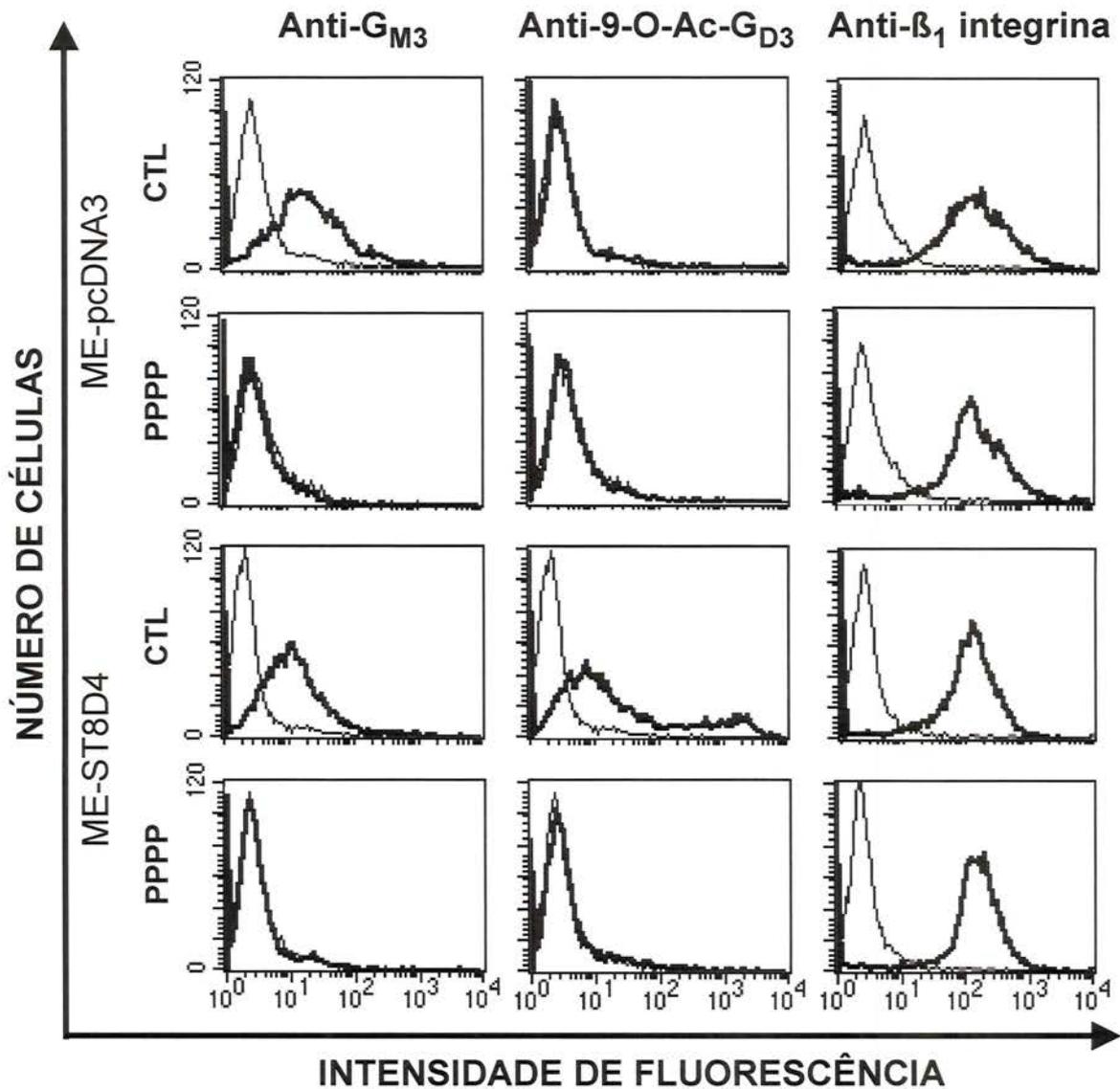


Figura 12: A depleção de glicoesfingolipídios não altera a expressão de integrinas na superfície das células derivadas de melan-a. Após tratamento por 72 horas com PPPP (inibidor da glucosilceramida sintase), as células ME-pcDNA3 e ME-ST8Sial foram analisadas por citometria de fluxo, usando-se anticorpos anti-gangliosídeos e anti-integrina. O tratamento foi eficiente quanto à depleção de gangliosídeos na superfície celular, como mostrado nas colunas da esquerda e do meio, comparando-se com os grupos controle (CTL), mostrando respectivamente a reatividade quanto a anti-G_{M3} e anti- 9-O-acetil-G_{D3}. Nestas mesmas condições, não houve alterações no nível de β₁ integrinas na superfície celular (coluna da direita). Nos histogramas, a linha fina representa o controle negativo da reação, enquanto as linhas grossas correspondem à incubação com os anticorpos específicos.

por citometria de fluxo e mostraram-se similares (Figura 12). Os níveis de β_1 integrina não foram alterados após o tratamento de PPPP. Assim observamos que os mediadores da resposta migratória, as integrinas, não estão alterados nas diferentes células estudadas após a depleção de glicosfingolipídios.

4.5. AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS ASSOCIADOS À INTERAÇÃO CÉLULA-MATRIZ EXTRACELULAR

4.5.1. Adesão

A participação de gangliosídios no processo de adesão celular é descrita em alguns trabalhos. A noção prevalente é a de que gangliosídios poderiam atuar modulando a função de integrinas e sua afinidade por ligantes de matriz extracelular como vitronectina e fibronectina^{30,60}. Avaliamos a adesão dos transfectantes a diferentes elementos de matriz como laminina, fibronectina, vitronectina e colágeno IV. Aos três primeiros elementos testados as células ME-ST8Sial e seus clones aderiram mais que as células ME-pcDNA3 (Figura 13). Em relação ao colágeno IV não houve adesão de nenhum tipo celular testado.

4.5.2. Migração

4.5.2.1 Migração Estimulada por Laminina

Os transfectantes foram submetidos a experimentos de migração em laminina utilizando-se câmaras do tipo "Transwell". Nestes experimentos, avaliamos tanto o efeito haptotático como quimiotático da laminina, uma vez que a molécula em solução é progressivamente adsorvida na face inferior do filtro de polycarbonato que separa os compartimentos da câmara de migração. Com 2 horas de migração pudemos observar uma maior migração das células ME-ST8Sial e seus clones para laminina em relação a ME-pcDNA3 (Figura 14). Com o mesmo "pool" de células avaliamos o perfil das β_1 -integrinas e dissialogangliosídios através de citometria de fluxo como controle da expressão destas moléculas. Este resultado sugere que G_{D3} e seu derivado (9-O-acetil- G_{D3}) poderiam estar de alguma forma modulando a função das integrinas na migração. Pôde-se notar que as células ME-ST8Sial ocuparam um maior número de poros do que as células controle (dado não mostrado), além de terem se espalhado mais rapidamente pela face inferior da membrana de polycarbonato no período do experimento. Estes resultados sugerem que os transfectantes ME-ST8Sial respondem mais rapidamente aos estímulos migratórios de laminina.

4.5.2.2. Efeito da Depleção de Gangliosídios na Migração Celular

Uma vez estabelecidas as condições que nos permitiram depletar metabolicamente as células de gangliosídios, a capacidade migratória das células tratadas ou não com PPPP foi avaliada. Células ME-pcDNA3

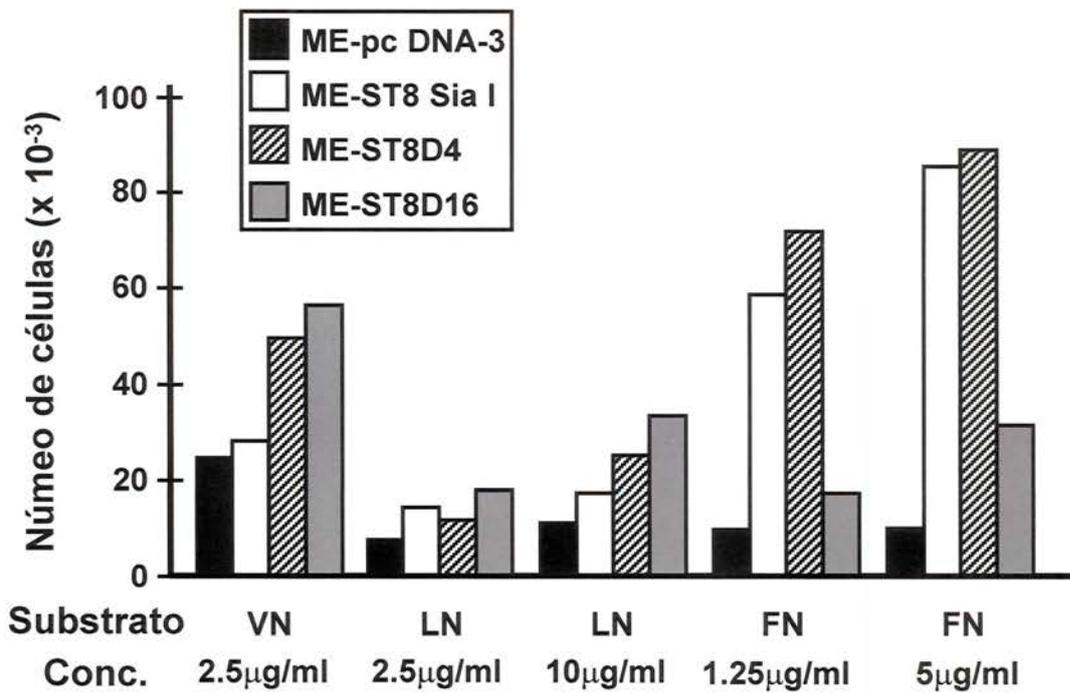


Figura 13: ME-ST8Sial e seus clones aderem mais a elementos de matriz que as células ME-pcDNA3. As células que expressam G_{D3} e seus derivados aderem mais a fibronectina (1,25 e 5 µg/ml), vitronectina (2,5 µg/ml) e laminina (2,5 e 10 µg/ml). Adesão à albumina sérica bovina usada para bloqueio consistiu no controle de adesão não dependente dos elementos de matriz extracelular. Os valores representados no gráfico representam a adesão específica.

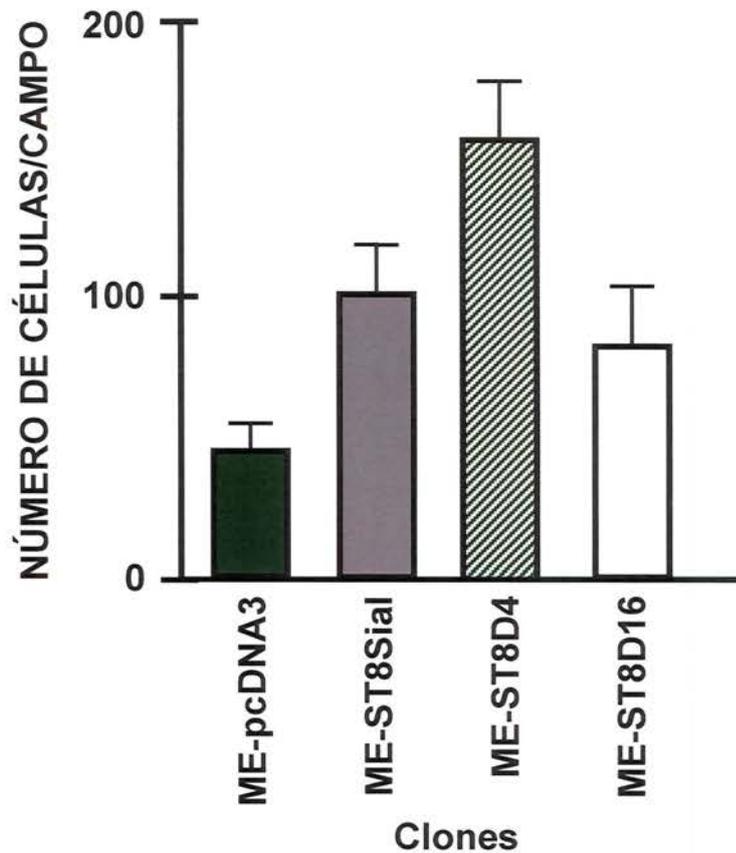


Figura 14: ME-ST8Sial e seus clones migram mais em resposta a laminina que as células ME-pcDNA3. O efeito de G_{D3} endógeno nestas células foi estudado com experimentos de migração estimulado por laminina ($10\mu\text{g/ml}$) utilizando-se câmaras "Transwell". Estes ensaios de migração foram feitos em intervalos de duas horas em condições de cultura. O número de células que migraram para a superfície inferior dos filtros de polycarbonato foi contado diretamente ao microscópio, usando-se objetiva de 20 x (campo equivalente a $0,025\text{ mm}^2$). Os clones expressando dissialogangliosídeos foram significativamente mais migratórios que o transfectante controle (ANOVA, seguida de teste de Bonferroni para múltiplas comparações, $p < 0.01$).

(G_{M3}^+ e G_{D3}^-) e células ME-ST8D4 (G_{M3}^+ e G_{D3}^+) foram convertidas a G_{M3}^- e G_{D3}^- . Nestas situações as células G_{M3}^- e G_{D3}^- apresentaram-se sempre mais migratórias que as células G_{M3}^+ e G_{D3}^+ , que por sua vez são mais migratórias que as células G_{M3}^+ e G_{D3}^- (Figura 15-17). Ou seja, nós observamos um aumento de células migratórias em todos os transfectantes, tanto os originalmente positivos para a presença de G_{D3} como naqueles que não apresentavam o dissialogangliosídeo.

4.5.2.3. Efeito da Depleção de Colesterol na Resposta Migratória Estimulada por Laminina

As células ME-ST8D4, a qual em nossos ensaios anteriores de migração apresentavam-se mais migratórias, foram submetidas ao tratamento com β -ciclodextrina (CDX) em concentração 2,5 e 10 μ M. Estas concentrações são eficientes na depleção de colesterol das membranas plasmáticas. Nestes ensaios utilizamos tanto células tratadas previamente com PPPP, como células não tratadas. Observamos um consistente aumento de migração nas células ME-ST8D4 tratadas com CDX (Figura 15). A depleção de colesterol da superfície celular está associada a um aumento da migração celular.

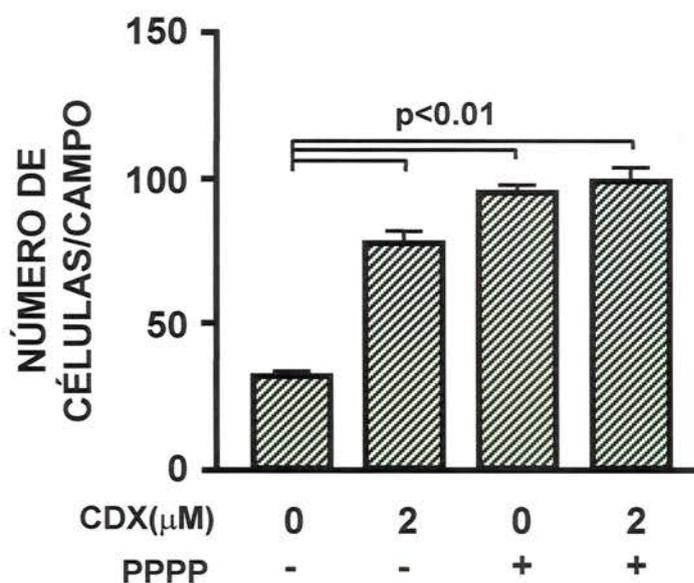


Figura 15: Depleção de colesterol da membrana plasmática está associada a um aumento na resposta migratória de células ME-ST8D4. O efeito da depleção de colesterol, necessário para estabilidade funcional dos microdomínios enriquecidos em glicosfingolípídios, foi avaliado tratando-se as células que expressam G_{D3} endógeno com β -ciclodextrina (CDX, 2 μ M). As células foram incubadas com CDX por 30 minutos em suspensão a 37°C e então avaliadas quanto a resposta migratória ainda em presença de CDX durante o período de 2 horas. Ainda, trataram-se as células com o inibidor da glucosilceramida sintase (PPPP) avaliando seu potencial migratório. Os tratamentos com CDX e PPPP não mostraram um efeito sinérgico com relação a migração celular frente a laminina. Estes experimentos de migração foram feitos em "Transwell" onde a membrana foi sensibilizada com laminina (10 μ g/ml). As células depletadas de colesterol ou de glicosfingolípídios foram significativamente mais migratórias que as células em condição controle (ANOVA, seguida de teste de Bonferroni para múltiplas comparações, $p < 0.01$).

4.5.2.4. Efeito G_{M3} e G_{D3} Exógenos na Resposta Migratória Estimulada por Laminina nas Células ME-pcDNA3 e ME-ST8D4 quando Depletadas ou não de Gangliosídios

Expusemos as células ME-pcDNA3 (G_{M3}^+ e G_{D3}^-) a concentrações crescentes de G_{D3} exógeno e avaliamos o perfil migratório destas células. Em intervalos de 2 horas, observamos que as células expostas a G_{D3} exógeno migram mais prontamente que as células não expostas a G_{D3} . Esta diferença deixa de existir quando o ensaio de migração é realizado em intervalos mais longos (4 horas) (Figura 16).

Expusemos as células ME-pcDNA3 (G_{M3}^+ e G_{D3}^-) não tratadas e tratadas com PPPP e ME-ST8D4 tratadas com PPPP (G_{M3}^- e G_{D3}^-) a G_{M3} exógeno (na concentração de $10\mu\text{M}$); e, avaliamos o perfil migratório destas células. G_{M3} inibiu a migração em todas as situações testadas. Assim, as células G_{M3}^- e G_{D3}^- apresentaram-se sempre mais migratórias que as células G_{M3}^+ e G_{D3}^+ , que por sua vez são mais migratórias que as células G_{M3}^+ e G_{D3}^- (Figura 17). Estes ensaios sempre foram realizados em transwells como padronizados anteriormente e com todos os controles de expressão de gangliosídios por citometria de fluxo.

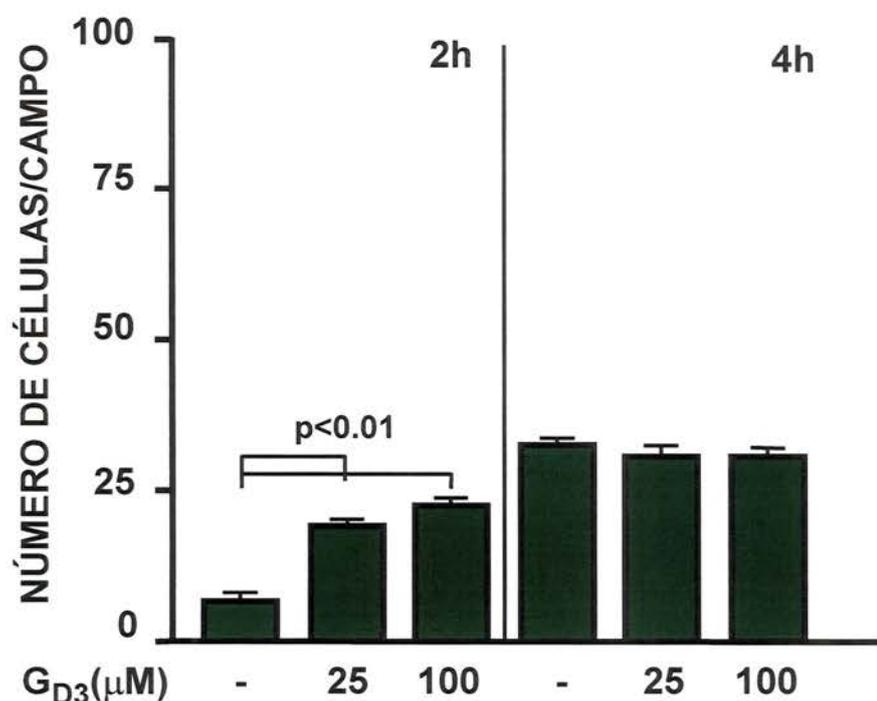


Figura 16: Exposição das células a G_{D3} exógeno aumenta a sua resposta migratória. Células ME-pcDNA3, foram incubadas com diferentes concentrações de G_{D3} exógeno por 30 minutos a 37°C e então avaliadas quanto ao potencial migratório induzido por laminina. As células ME-pcDNA3 tratadas com G_{D3} exógeno mostraram-se mais migratórias em direção à laminina do que as células em condição controle (ME-pcDNA3) no intervalo de 2 horas. No intervalo de 4 horas de migração celular, não foram observadas diferenças entre ME-pcDNA3 tratadas ou não com G_{D3} exógeno. Estes experimentos de migração foram feitos em "Transwell" onde a membrana foi sensibilizada com laminina (10μg/ml). A análise estatística foi feita usando-se ANOVA, seguida de teste de Bonferroni para múltiplas comparações.

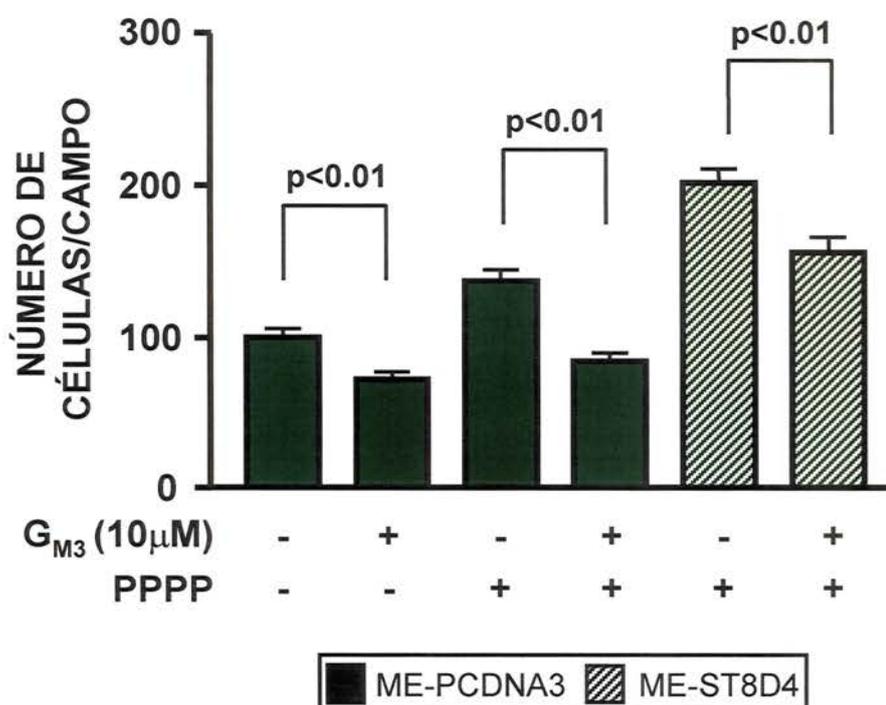


Figura 17: A resposta migratória de ME-pcDNA3 e ME-ST8Sial diminui na presença de G_{M3} exógeno. O efeito inibitório de G_{M3} exógeno foi avaliado nestas células tanto na presença de outros gangliosídeos como na sua ausência (PPPP). A resposta migratória frente a laminina foi avaliada por um período de 3 horas. Estes experimentos de migração foram feitos em "Transwell" onde a membrana foi sensibilizada com laminina (10 μ g/ml). A análise estatística foi feita usando-se ANOVA, seguida de teste de Bonferroni para múltiplas comparações.

4.5.2.5. Avaliação da Presença da Tetraspanina, CD9, em diferentes Linhagens Celulares e sua Distribuição Subcelular em SK-MEL 28 uma Linhagem de Melanoma Humano.

Melan-a transfectadas, ME-pcDNA3 e ME-ST8Sial, não expressam CD9. Mas a linhagem de melanoma humano, SK-MEL-28, expressa CD9 além de G_{D3} (dado não mostrado) e 9-O-acetil- G_{D3} , em sua superfície celular, como avaliadas por citometria de fluxo (Figuras 18). A distribuição subcelular desta tetraspanina em SK-MEL-28 apresenta uma nítida distribuição e marcação de membrana da célula (Figura 19).

4.6. OBTENÇÃO DOS TRANSFECTANTES DE TM1 PARA G_{D3}

SINTASE

A linhagem tumorigênica, TM1, foi clonada por crescimento independente de ancoragem, a partir da linhagem de melanócitos murinos, melan-a.⁶ A utilização desta linhagem nos permitiria determinar o papel dos dissialogangliosídeos na progressão tumoral de melanomas *in vivo*.

Assim a linhagem de melanoma murino, TM1, foi utilizada para ensaios de transfecção heteróloga e estável do gene humano da sialiltransferase ST8Sial. Esta enzima, como já foi dito, converte G_{M3} em G_{D3} . G_{D3} pode ainda sofrer modificações de O-acetilação, originando, mais freqüentemente, o seu derivado 9-O-acetil- G_{D3} . As células transfectadas com o plasmídeo contendo a sialiltransferase originaram os clones TM1.ST8 e as células transfectadas com o plasmídeos vazios (controle) originaram

TM1.pcDNA3. A expressão de gangliosídios na superfície celular foi verificada através de citometria de fluxo. TM1ST8 passou a expressar G_{D3} e seu derivado 9-O-acetil- G_{D3} em sua superfície celular enquanto TM1pcDNA3 não.

Em nossa primeira transfecção foi observada uma boa expressão do transgene como avaliada pelo acúmulo de G_{D3} e seu derivado (Figura 20). Mas apesar da presença do antibiótico de seleção (G418), estas células perderam progressivamente a expressão de G_{D3} ; que se mostrava ausente após 45 dias da transfecção (Figura 20).

4.6.1. Avaliação dos Níveis de G_{M3} e G_{D3} nos Extratos de Lipídios nos Clones Gerados na Transfecção de G_{D3} Sintase em TM1

Para quantificar e verificar os níveis intracelulares destes dissialogangliosídios (G_{D3} e/ou 9-O-acetil- G_{D3}) e/ou variação nos níveis intracelulares de G_{M3} , nós avaliamos os extratos lipídicos dos transfectantes de TM1 com o gene da G_{D3} sintase por ELISA. Este ensaio somente foi realizado após perda de expressão de G_{D3} e/ou 9-O-acetil- G_{D3} detectada pela citometria de fluxo. Nós analisamos os extratos lipídicos utilizando os seguintes anticorpos: R24 (anti- G_{D3}), DH2 (anti- G_{M3}) e Jones (9-O-acetil- G_{D3}). Primeiramente não detectamos acúmulos de G_{D3} em células TM1 transfectadas com G_{D3} sintase. Em um segundo conjunto de experimentos, nós avaliamos se o gangliosídio G_{D3} poderia estar sendo convertido para 9-O-acetil- G_{D3} (e por isto a ausência de reatividade observada usando-se o mAb R24). Para tanto, os lipídios foram expostos a NaOH; como feito

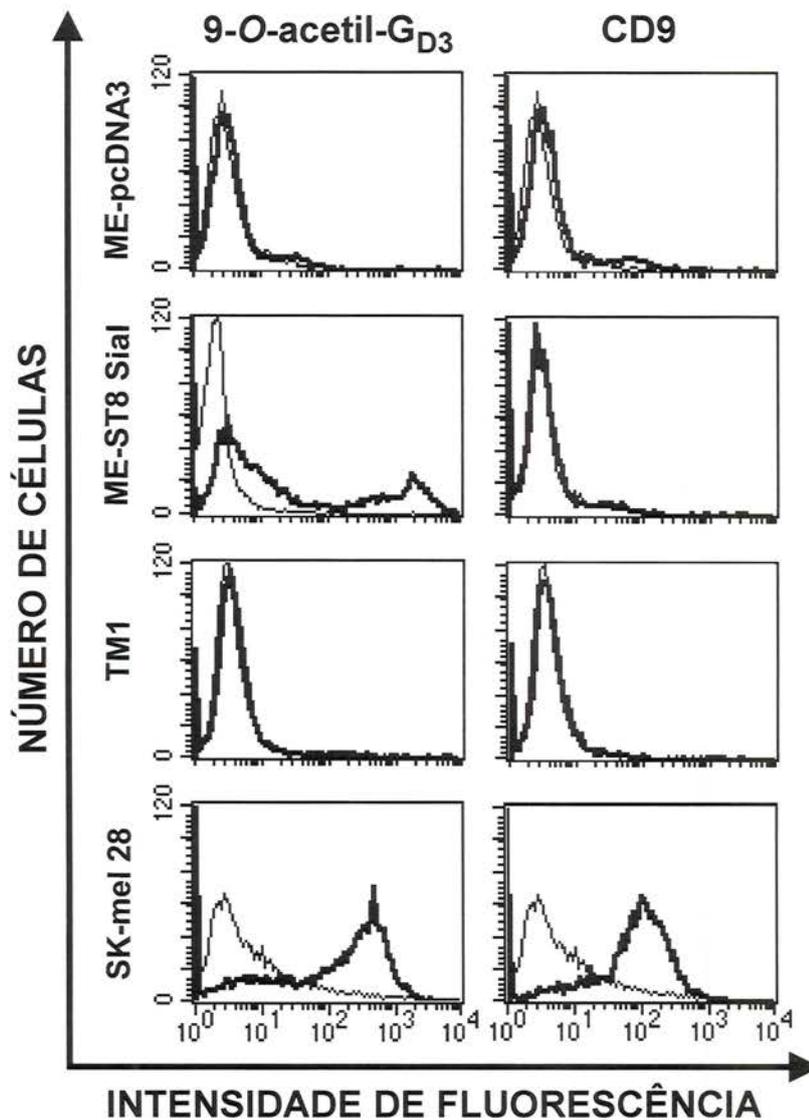


Figura 18: Histogramas representando a expressão de CD9 e 9-O-acetil-G_{D3} na superfície dos transfectantes de SK-MEL-28. Os transfectantes de melan-a não expressam CD9, enquanto a linhagem de melanoma humano, SK-MEL 28, apresenta CD9 em sua superfície. A linha fina representa a reatividade obtida com os controles isotípicos das imunoglobulinas utilizadas (controle negativo). As linhas em negrito mostram a reatividade aos anticorpos: Jones (anti-9-O-acetil-G_{D3}) e anti-CD9.

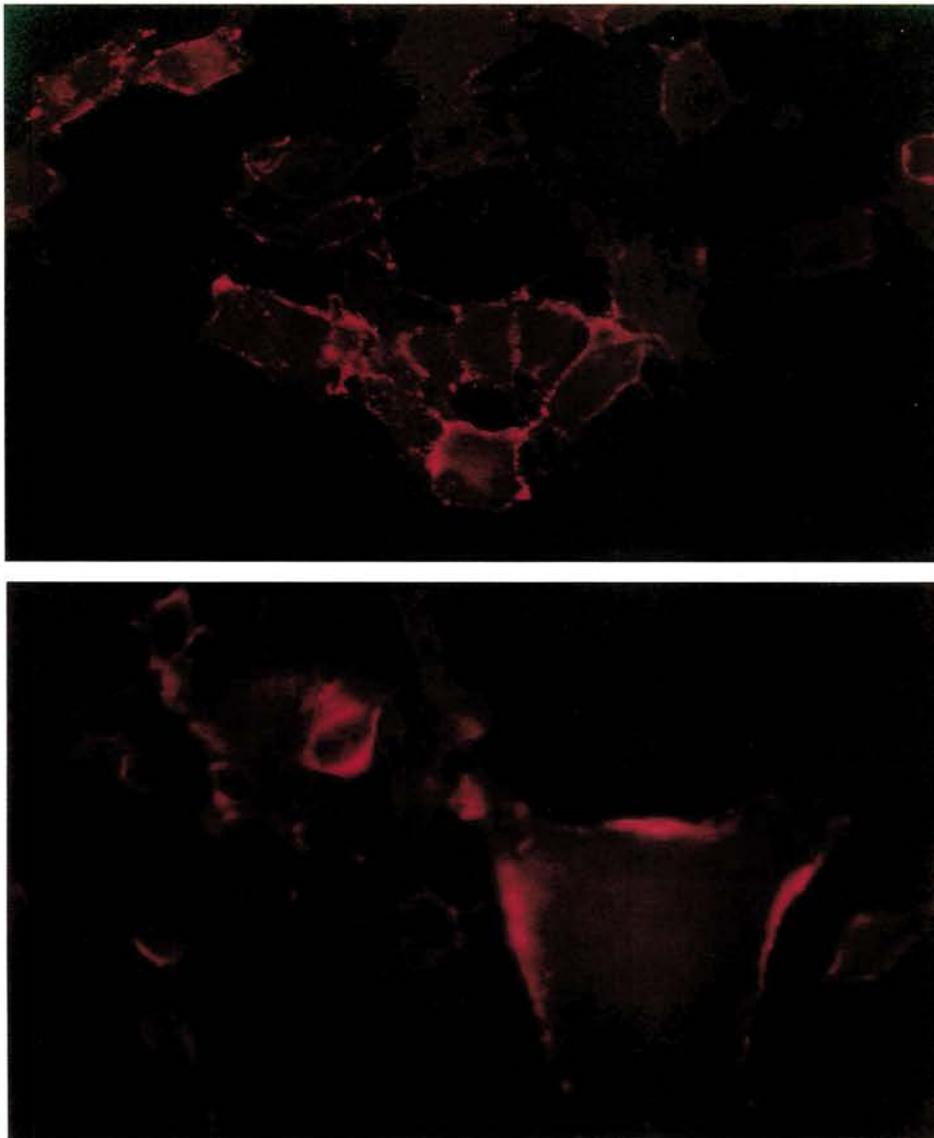


Figura 19: CD9 está presente na superfície das células SK-MEL-28. Neste ensaio as células foram plaqueadas sobre lamínulas redondas de vidro na presença de meio de cultura. Após a confluência das células. Um risco é feito para abrir um caminho na lamínula, a matriz extracelular depositada na região do risco age como atrativo para que as células da bordas desta superfície livre de células iniciem sua migração. Após 24 horas de migração as células foram incubadas com anti-CD9, e analisadas à microscopia de fluorescência.

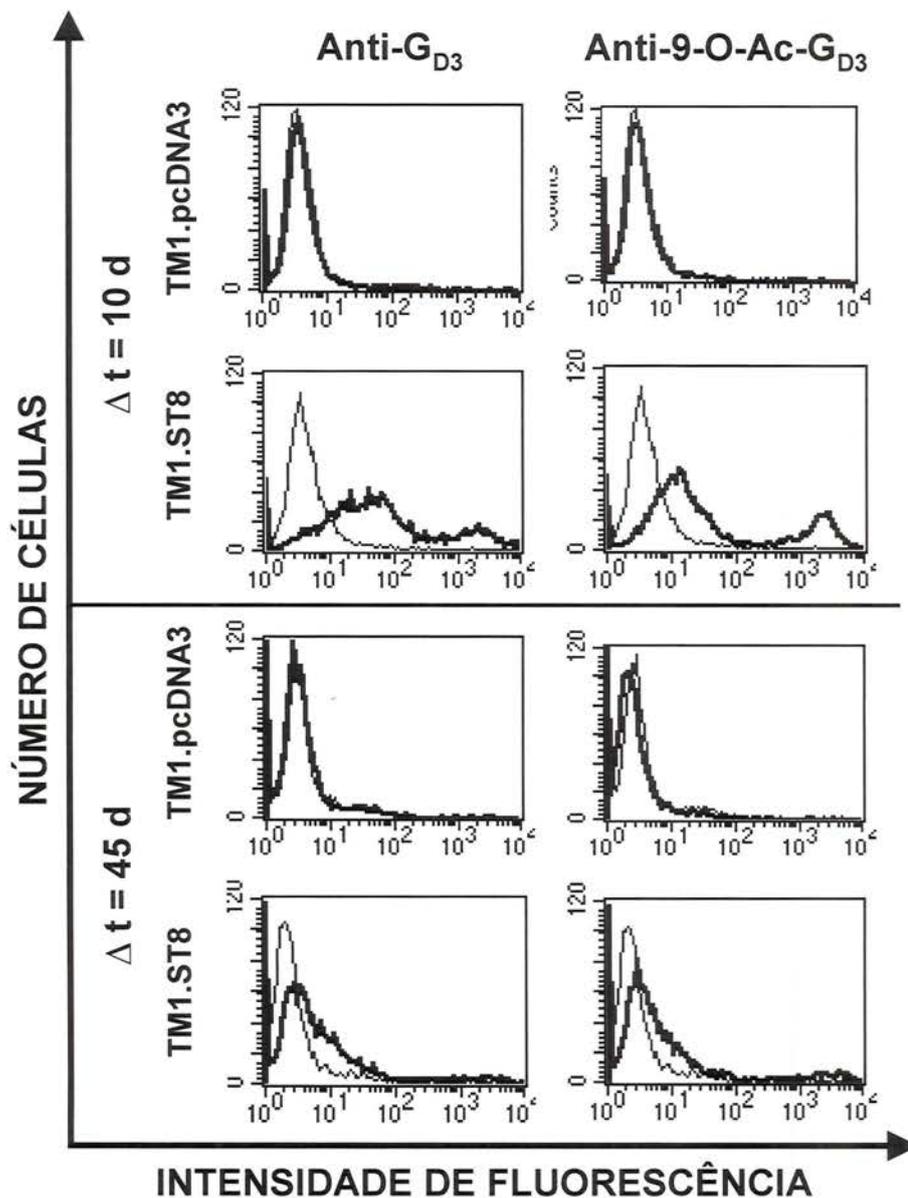


Figura 20: A expressão de dissialogangliosídeos em células transfectadas é perdida ao longo do processo de seleção clonal com o antibiótico G418. Histogramas representando a expressão de dissialogangliosídeos (G_{D3} e 9-O-acetil G_{D3}) na superfície dos transfectantes TM1.pcDNA3 e TM1.ST8, dez dias após a transfecção com *ST8Sia I*. A linha fina representa a reatividade obtida com os controles isotópicos das imunoglobulinas utilizadas (controle negativo). As linhas em negrito mostram a reatividade aos anticorpos: R24 (anti- G_{D3}) e Jones (anti-9-O-acetil- G_{D3}). Estes níveis de expressão de dissialogangliosídeos são mantidos somente por 10 dias, após isto os níveis caíram progressivamente a níveis indetectáveis por citometria de fluxo.

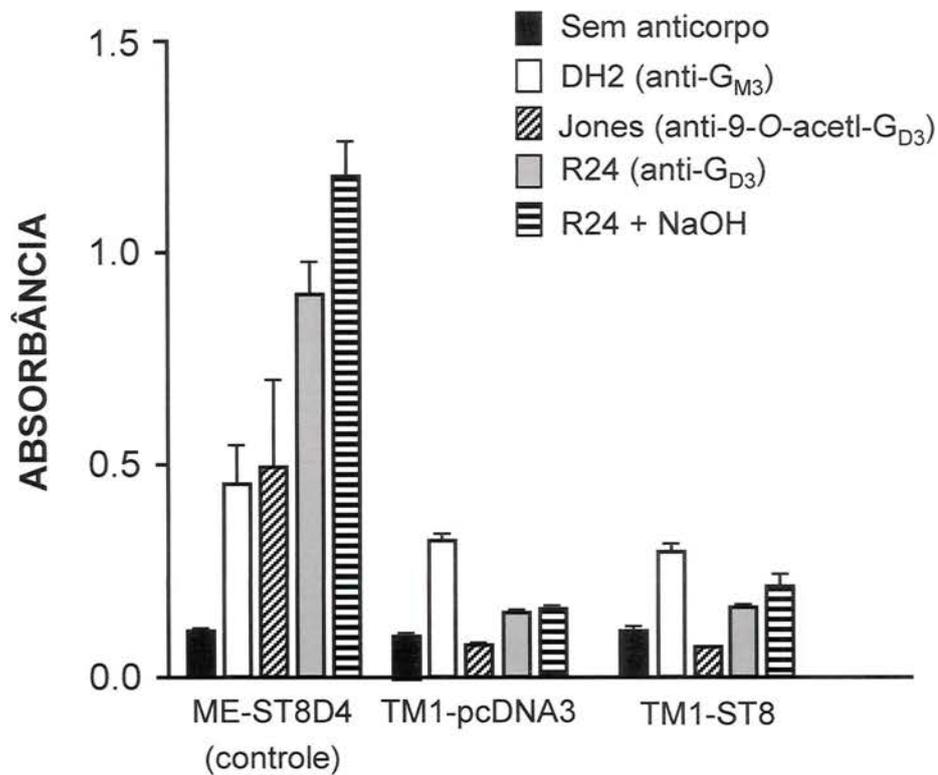


Figura 21: Ausência de reatividade contra anticorpos anti- G_{D3} em transfectantes TM1.ST8. Por citometria de fluxo, apenas os gangliosídeos presentes na superfície celular foram analisados. Com o objetivo de avaliar o “pool” global destes gangliosídeos, extratos lipídicos dos transfectantes foram preparados, adsorvidos em placas de poliestireno de 96 poços, avaliados em ensaio de ELISA. Extratos de ME-ST8D4 foram utilizados como controle positivo da reação. Foi possível observar lipídios reativos ao anticorpo DH2 (anti- G_{M3}) em células derivadas de TM1, mas não reativos a R24 (anti- G_{D3}), mesmo após à exposição dos lipídios a NaOH que desacetila gangliosídeos O-acetilados. Assim, TM1.ST8 não apresenta quantidades detectáveis de G_{D3} .

anteriormente ¹¹⁰, o que leva à des-O-acetilação por clivagem alcalina do resíduo de ácido siálico. Não verificamos presença destes dissialogangliosídios entre os transfectantes (controle e *G_{D3} sintase*) (Figura 21).

4.7. AVALIAÇÃO DE MORTE CELULAR POR *G_{D3}* EM TM1

4.7.1. Nos Transfectantes Transientes de TM1 para *G_{D3} sintase*

4.7.1.1. Avaliação de Morte Celular Espontânea pelo Ensaio de Iodeto de Propídio

Para avaliar a morte celular nas células TM1 transfectadas transientemente com o plasmídeo controle (G_{M3}^+/G_{D3}^-) e com a sialiltransferase, *G_{D3} sintase* (G_{M3}^+/G_{D3}^+) nós avaliamos se estas células apresentariam a apoptose não induzida. Esta avaliação foi feita através da incorporação de iodeto de propídio, um fluorocromo que se intercala estequiometricamente a cada 4 pares de bases do DNA. Após a fixação e permeabilização da membrana celular com etanol a 70%, as células foram ressuspensas em uma solução contendo iodeto de propídio e RNase para degradação do RNA da célula e assim a possível avaliação do conteúdo apenas do DNA celular. Estas células foram analisadas em citometria de fluxo como descrito em materiais e métodos.

As células transfectadas foram coletadas em diferentes tempos: 48, 96, 144 e 192 horas. Não foram observadas diferenças nos níveis de morte celular entre as diferentes transfectantes. Apesar de quantidades

progressivamente menores dos dissialogangliosídios em cada ponto, mesmo nos intervalos iniciais, quando a expressão dos gangliosídios foi mais alta. Neste experimento concluímos que a análise de morte celular nos transfectantes deveria ser realizada no período de 24 a 48 horas após a transfecção, quando os níveis de expressão de G_{D3} são maiores.

4.7.1.2. Avaliação da Morte Celular Induzida por Estaurosporina pelo Ensaio de JC1:

Para verificar a sensibilidade das células TM1.ST8 (G_{M3}^+/G_{D3}^+) à apoptose induzida, nós novamente transfectamos TM1 transientemente com os plasmídeos controle e com a G_{D3} sintase em placas de 90mm. Após 5 a 15 horas estas células foram divididas em 3 alíquotas iguais em número de células e mantidas em meio RPMI suplementado com 5% de SBF. A primeira alíquota foi utilizada na análise da presença dos dissialogangliosídios por citometria de fluxo. As outras duas alíquotas foram utilizadas na análise de morte celular por JC1 em 24 e 48 horas após a transfecção.

A estaurosporina é uma droga que induz apoptose via inibição de proteínas serino-treonina quinases. As células melan-a e TM1 e os seus respectivos transfectantes (controle e com ST8 Sia I) foram plaqueadas, e após sua adesão, foram incubadas por 8-15 horas na presença 250nM de estaurosporina (dose sub-letal). Posterior ao período de tratamento estas células foram submetidas ao ensaio de avaliação de morte celular por JC1. Nós observamos que 24 horas após a transfecção, as células TM1.ST8

parecem ser mais sensíveis ao tratamento com estaurosporina do que as outras células (TM1 controle e melan-a controle e transfectada com G_{D3} sintase) (Figura 22 A). Em outros ensaios, a magnitude da resposta observada mostrou-se associada ao nível de expressão de G_{D3} acumulado na superfície celular. Como esta variável não é facilmente controlável em ensaios de transfecção, optou-se por avaliar o efeito da adição do dissialogangliosídeo exógeno.

4.7.2. Avaliação da Morte Celular Induzida por Estaurosporina em TM1 na Presença ou não de G_{D3} Exógeno pelo Ensaio de Iodeto de Propídio

Para avaliar a sensibilidade das células TM1 a apoptose induzida, as células foram incubadas com G_{D3} exógeno em meio na ausência de soro, para melhor incorporação do gangliosídeo. Após 30 minutos as células foram então expostas ao indutor de morte celular, estaurosporina (4 horas de incubação). A estaurosporina foi testada em nosso laboratório em outras linhagens como também para melan-a e TM1 e dose sub-letal foi considerada 250nM. Esta dose mostrou-se alta em nossos primeiros ensaios; assim, nós passamos a utilizar uma dose bem menor que nos ensaios anteriores (5nM, 25nM e 50nM). Como nos ensaios utilizando transfecções transientes (item acima), observamos diferenças quanto à indução de morte nas células tratadas por estaurosporina na presença de G_{D3} exógeno (Figura 22 B).

4.8. ANÁLISE DA EXPRESSÃO, POR RT-PCR, DA G_{M2}/G_{D2} SINTASE E G_{D3} SINTASE NAS CÉLULAS TM1 TRANSFECTADAS COM O GENE DA G_{D3} SINTASE

Nós avaliamos o perfil de mRNA das enzimas, G_{M2}/G_{D2} sintase e G_{D3} sintase, nas células TM1 transfectada com G_{D3} sintase. Foram extraídos RNAs total das linhagens: TM1, TM1.ST8, TM1.pcDNA3, ME-pcDNA3, ME-ST8D4 e B16-F10 (Figura 23). Os iniciadores foram desenhados dentro de regiões exônicas específicas para o gene de cada enzima estudada. O mRNA de G_{D3} sintase utilizado para a transfecção é humano, como os iniciadores desenhados, assim somente aquelas células que foram transfectadas com a construção pcDNA3 + G_{D3} sintase poderão expressar o mensageiro da enzima. Já para G_{M2}/G_{D2} sintase os iniciadores são de camundongo visto que estamos avaliando a expressão nativa desta enzima. TM1 parental e ME-pcDNA3 foram negativas para as duas enzimas. TM1.ST8 e ME-ST8D4 foram positivas para as duas enzimas. E TM1.pcDNA3, somente para G_{M2}/G_{D2} sintase.

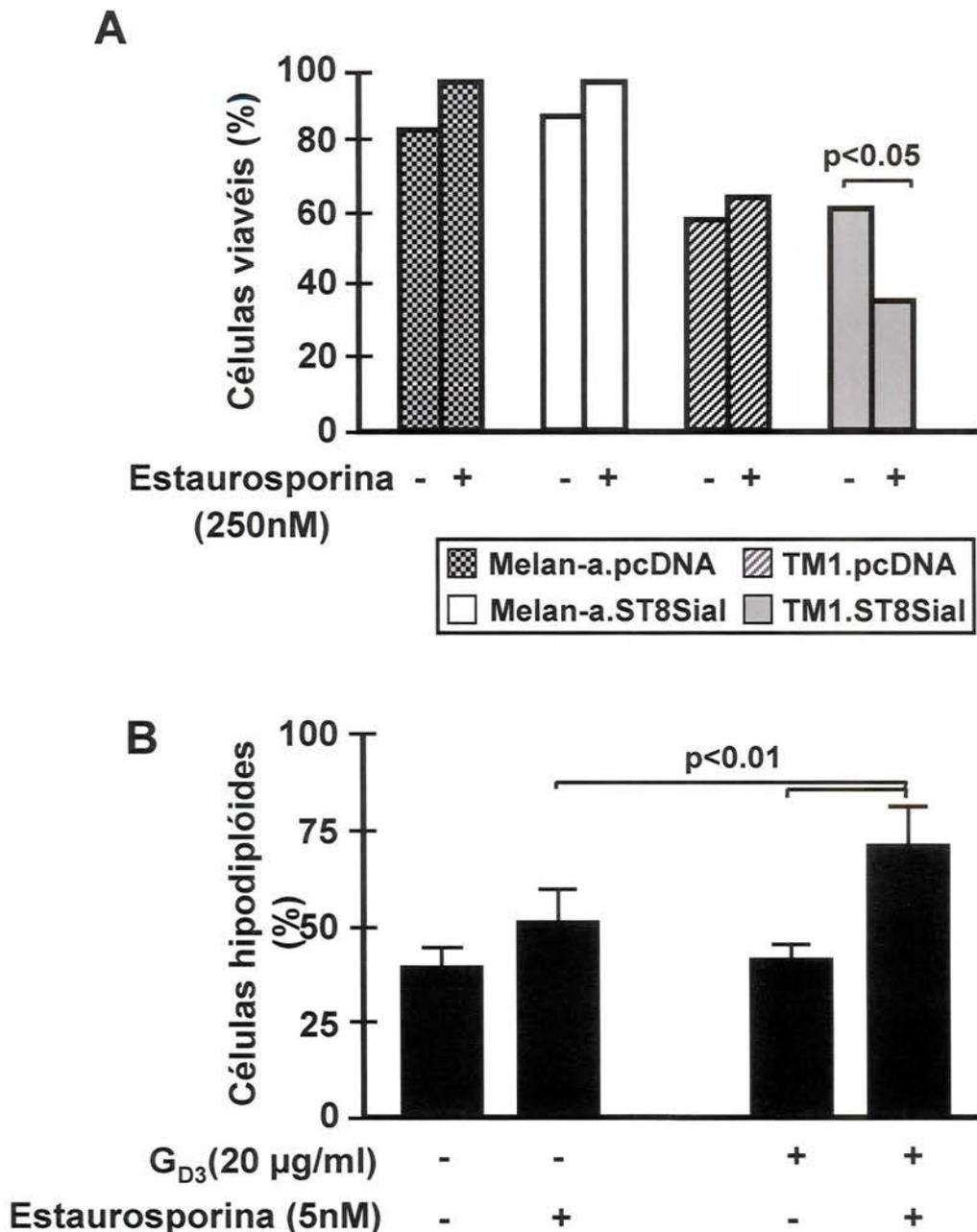


Figura 22: TM1.ST8 parece ser mais sensível à morte induzida por estaurosporina do que TM1.pcDNA. (A) O efeito de sensibilidade a estaurosporina pelos transfectantes de TM1 somente foi observado em 24 horas após a transfecção. Em melan-a não foram observadas diferenças de morte celular induzida por estaurosporina nos seus diferentes transfectantes (melan.pcDNA e melan.ST8). As células foram mantidas sob condições de cultivo e incubadas com estaurosporina em dose sub-lethal (250 nM) por 8 horas. A morte celular foi avaliada por JC-1, e analisada em citometria de fluxo. **(B)** G_{D3} exógeno sensibilizou células TM1 à morte celular induzida por estaurosporina. As células TM1 foram expostas a G_{D3} exógeno por 30 minutos sob condições de deprivação de soro e posteriormente incubadas por 4 horas com estaurosporina (5 nM). A morte celular foi avaliada pelo ensaio de iodeto de propídio.

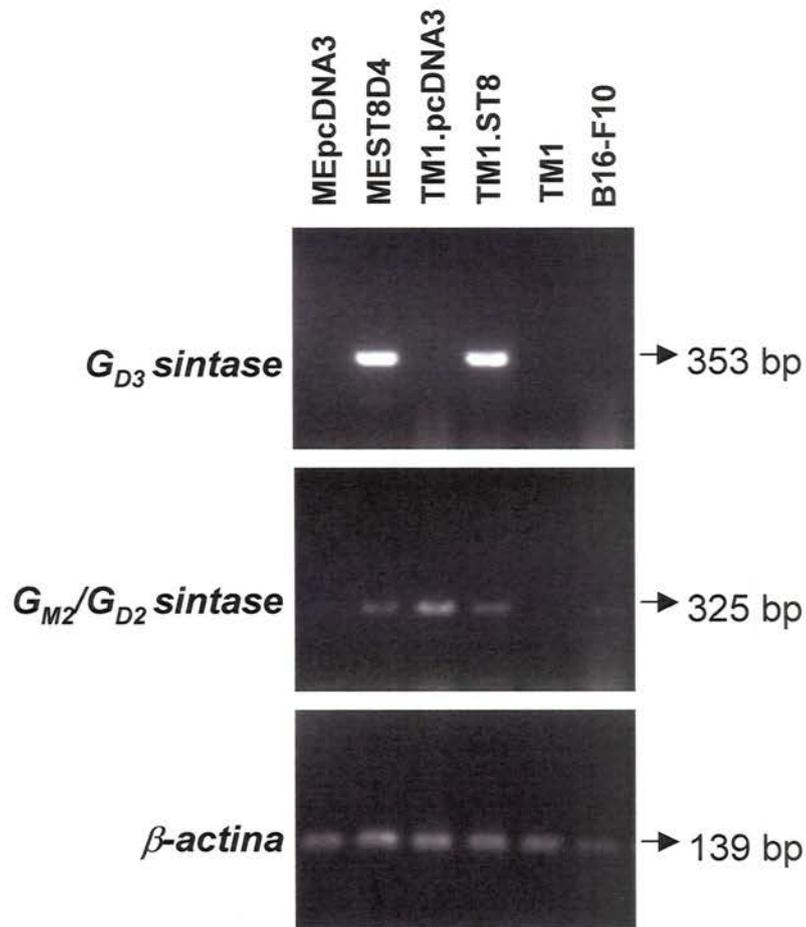


Figura 23: Os genes da enzimas G_{D3} sintase são expressos por MEST8D4 e TM1.ST8, mas não pelas linhagens ME-pcDNA3, TM1.pcDNA, TM1 e B16-F10. As células ME-ST8D4 e TM1.ST8 transfectadas com o gene heterólogo da G_{D3} sintase também expressam o mRNA da enzima G_{M2}/G_{D2} sintase. ME-pcDNA3 não expressa G_{M2}/G_{D2} sintase ao contrário de TM1-pcDNA3. O RNA total das células foi extraído e submetido a RT-PCR, utilizando-se iniciadores específicos como descrito em material e métodos. A amplificação do mRNA de β -actina foi usada como controle da integridade das amostras de RNA.

4.9. TEMPO DE DUPLICAÇÃO E TUMORIGÊNESE *in vivo* SEMELHANTE ENTRE AS LINHAGENS TM1.PCDNA E TM1.ST8.

Analisamos a cinética de proliferação das linhagens TM1 transfectantes com o plasmídeo pc-DNA-3 contendo ou não o gene da G_{D3} sintase. Não houve diferenças estatisticamente significativas nos tempos de duplicação de TM1-pcDNA e dois transfectantes TM1.ST8 independentes. Os tempos de duplicação foram estimados entre 30 e 40 horas. As curvas de proliferação são mostradas na Figura 24. Não houve morte celular significativa no período analisado (dado não mostrado). *In vivo*, todos os transfectantes mantiveram a capacidade de tumorigênica da linhagem parental, TM1 (Figura 25). Não houve diferença significativa na taxa de crescimento dos tumores derivados do transfectantes, uma vez que a variabilidade encontrada foi alta (teste t de Student para amostras pareadas, $p= 0.2103$).

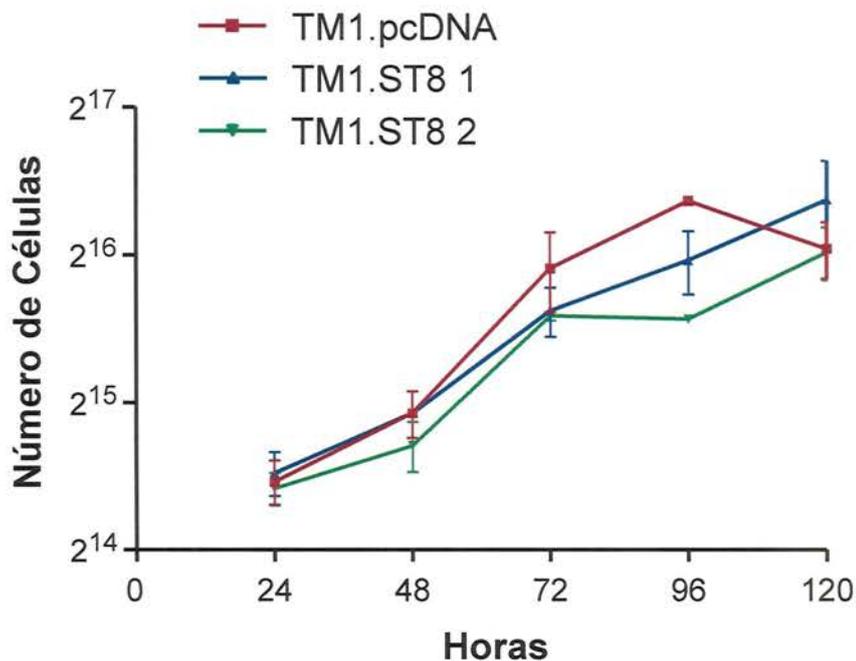


Figura 24: A expressão de G_{D3} sintase e G_{M2}/G_{D2} sintase não interfere na capacidade proliferativa dos transfectantes derivados de TM1. Curvas de proliferação foram obtidas plaqueando-se os diferentes transfectantes (triplicata) em placas de 6 poços, numa densidade inicial de 5×10^4 células/poço em meio completo. O número de células de cada transfectante foi determinado ao final de 1 a 5 dias a partir do plaqueamento inicial por contagem direta utilizando-se de um gradil na ocular do microscópio invertido. O tempo de duplicação destas linhagens variou entre 30 a 40 horas, mas sem diferenças significativas entre os diferentes transfectantes.

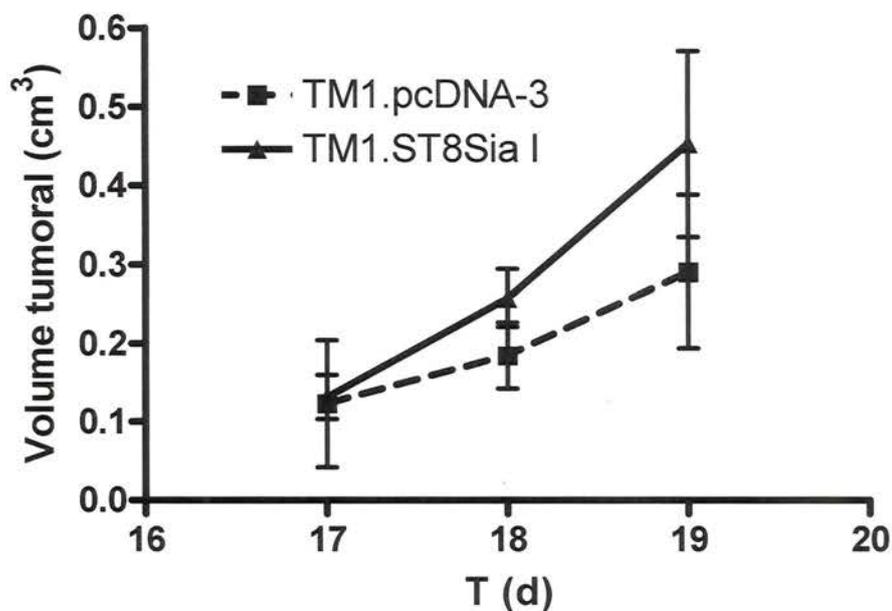


Figura 25: A expressão de GD3 sintase na linhagem TM1 não alterou o padrão de transplantabilidade e crescimento *in vivo* da linhagem parental. Camundongos C57/bl6 (n= 15, sendo 5 para a linhagem controle e 10 para a linhagem expressando o gene da GD3 sintase) foram injetados subcutaneamente com 5×10^4 células de cada transfectante (TM1.pcDNA-3 e TM1.ST8Sia I), após 17 dias o crescimento de tumores mensuráveis já era observado. A taxa de crescimento foi avaliada por medidas diárias, até que tumores ultrapassassem 0.5 cm^3 , quando os animais foram sacrificados. A taxa de crescimento tumoral não foi significativamente diferente nos dois grupos (representadas médias e desvio padrão).

4.10. ANÁLISE DO GENE *TP53* EM MELAN-A, ME-PCDNA3, ME-ST8SIAI E TM1

Este gene foi analisado por sequenciamento direto nas linhagens disponíveis no laboratório. Nós analisamos os exons 5 a 8 (códon 126-306) de *TP53*. Estas regiões representam 95% das mutações descritas para *TP53* e mutações nesta região estão relacionadas à disfunção deste gene. As linhagens TM1 e TM5 não apresentaram alterações na região codificadora de *TP53*, quando comparadas a células normais (cérebro de camundongo). Já em melan-a e seus transfectantes ME-pcDNA3 e ME-ST8Sial encontramos uma mutação tipo missense no exon 5 trocando uma histidina por um ácido aspártico no códon 175 (175^{Asp}) que também é observada em tumores humanos (Figura 26).

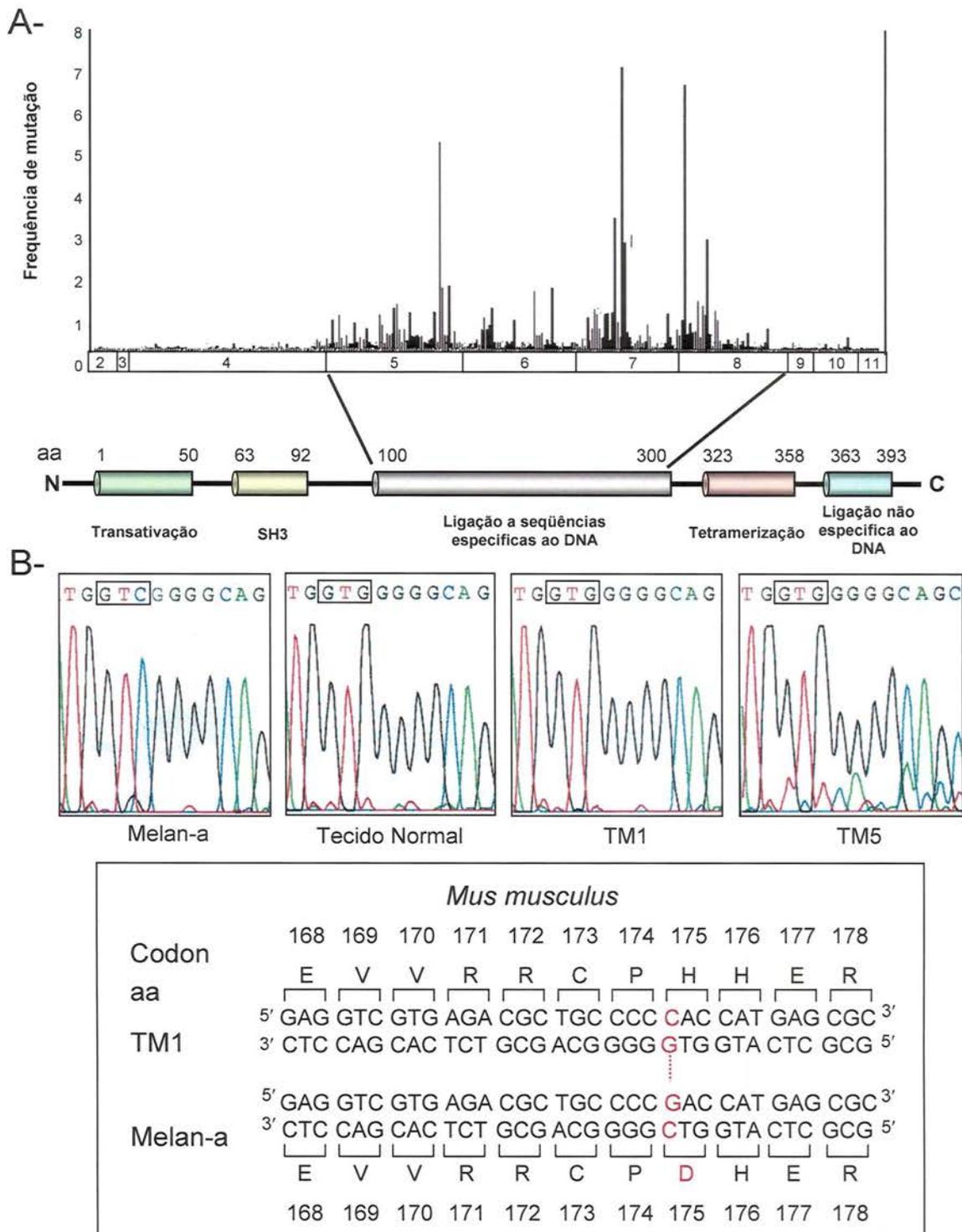


Figura 26: Melan-a, ME-pcDNA e ME-ST8Sial, mas não os clones tumorigênicos TM1 e TM5, apresentam mutação na região codificadora do gene *TP53*. (A) A análise foi realizada pelo sequenciamento direto dos exons 5 a 8 da região codificadora do gene. Estes éxons codificam a região de ligação de TP53 ao DNA, e é onde se concentram 95% das mutações em *TP53*. **(B)** Melan-a, ME-pcDNA e ME-ST8Sial apresentaram uma mutação missense no exon 5 no códon 175 do gene *TP53*, uma troca do aminoácido histidina para ácido aspártico.

5. DISCUSSÃO

5.1. REMODELAMENTO DO PEFIL DE GANGLIOSÍDIOS EM MELAN-A ATRAVÉS DA TRANFECÇÃO DA G_{D3} SINTASE

A transfecção da enzima G_{D3} sintase na linhagem de melanócitos melan-a nos proporcionou um modelo de estudo específico para o estudo do papel do gangliosídeo G_{D3} e seus derivados na progressão tumoral de melanomas. A obtenção de clones de ME-ST8Sial foi de grande interesse por pretendermos avaliar a implicação biológica dos diferentes níveis de expressão de G_{D3} e seus derivados, típicos de células tumorais, em células não tumorais. Ao migrarem, as células apresentam-se polarizadas ou assimétricas. Há assim, uma clara distinção entre regiões anteriores (frente de migração) e posteriores da célula. As extensões do tipo lamelipódios, filopódios e neurito-símile estão fortemente associadas à polimerização de filamentos de actina na região anterior da célula onde existe uma concentração de moléculas do citoesqueleto (como vinculina e talina) associadas a integrinas. Nas membranas da parte posterior da célula (uropódios) as integrinas vão se dissociando quer das moléculas do citoesqueleto como da matriz extracelular. Este gradiente de integrinas funcionais nos pólos anterior e posterior das células permite a migração de células em superfícies de matriz extracelular ^{16,96}. Através de imunofluorescência indireta avaliamos a distribuição subcelular dos

gangliosídeos em relação às β_1 -integrinas nas células ME-ST8Sial. G_{D3} e 9-O-acetil- G_{D3} foram encontrados na membrana plasmática destas células formando “clusters” em compartimentos (projeções) da membrana plasmática como lamelipódios, filopódios, neurito e uropódio co-localizando ou não com β_1 -integrinas. A análise comparativa do estado estacionário vs dinâmico de uma célula foi útil para a avaliação da simetria das moléculas envolvidas na migração. No estado estacionário foi visto que em ME-ST8Sial existe co-localização de G_{D3} e β_1 -integrina em “clusters” na membrana celular. Dados da literatura sugerem que além das integrinas, proteolipídios como os membros da família das tetraspaninas podem se localizar nestes mesmo domínio ⁵⁹.

As tetraspaninas (“TM4SF proteins”) são proteínas transmembrânicas de 25-50 kDa pertencentes a uma superfamília, constituída por 25-28 membros. Esta família de proteínas possui 4 domínios transmembrânicos e participam de importantes funções celulares no desenvolvimento como proliferação, ativação e motilidade celular ⁸. Estas moléculas interagem com α_3 , α_5 e β_1 integrinas em complexos nos microdomínios de membrana regulando algumas interações célula-célula e célula-matriz. Em tumores estas moléculas estão associadas à invasão e metástase ⁹¹. As principais tetraspaninas associadas a melanomas são CD63 e CD9. CD9 foi visto localizando-se nas interações de membrana de células de melanoma (A375) a células endoteliais exercendo um importante papel na migração transendotelial destas células ^{74,84}.

Nós avaliamos a presença da tetraspanina, CD9, em diferentes linhagens celulares e sua distribuição subcelular em SK-MEL 28 uma linhagem de melanoma humano. Melan-a transfectadas, ME-pcDNA3 e ME-ST8Sial, não apresentam expressão de CD9 na sua superfície celular. Mas a linhagem de melanoma humano, SK-MEL-28, expressa CD9 (Figura 19), além de G_{D3} e 9-O-acetil- G_{D3} (Figura 18), em sua superfície celular avaliadas por citometria de fluxo. A distribuição subcelular desta tetraspanina em SK-MEL-28 apresenta uma nítida distribuição e marcação de membrana da célula bem semelhante para β_1 integrinas (Figura 20).

HAKOMORI ⁴⁵ postula que gangliosídios e glicoesfingolipídios, por sua localização em microdomínios especializados da membrana plasmática enriquecida em moléculas envolvidas em transdução de sinal sejam fundamentais no processo de integração de sinais de proliferação, adesão e migração celular. Estes microdomínios seriam enriquecidos em moléculas como tetraspaninas e receptores de fatores de crescimento. Nestas balsas lipídicas ocorreria uma rede de interações dependente de carboidratos e por isso o nome de glicosinapse. Que seriam basicamente 3 tipos de glicosinapse: tipo 1: "clusters" de glicoesfingolipídios; tipo 2: Sítios de adesão tipo mucina O-ligados organizados com transdutores de sinal em microdomínio rico em colesterol; e tipo 3: Receptores de adesão associados ao complexo de integrinas, tetraspaninas e gangliosídios. Existem evidências da interação de G_{M3} , CD9 e α_3 integrina, nos microdomínios de tipo 1 e 3, modulando negativamente a adesão e migração em várias linhagens de câncer coloretal humano ⁵⁹.

Desta forma o estudo dessas moléculas (integrinas e tetraspaninas) associadas a gangliosídios em balsas lipídicas permitiriam a compreensão das interações e sinalizações importantes em eventos como adesão e migração. Para este tipo de abordagem, a linhagem SK-MEL-28 parece um bom modelo de estudo. Visto que acumula em sua superfície celular G_{D3} e seu derivado, além de CD9. No nosso modelo de estudo (melanoma murino) pode haver proteolídios homólogos a CD9 exercendo sua função e integrados às “glicosinapses”, descritas por HAKOMORI^{44,45} favorecendo assim a sinalização de adesão e migração da célula. Este proteolípido precisa ser identificado.

Quando observamos as células ME-ST8Sial no seu estado migratório, notamos uma segregação de G_{D3} das integrinas no uropódio (Figura 9) destas células. β_1 -integrinas não parecem presentes nesta região. Aparentemente, ao migrarem as células reciclam os receptores de matriz, mas não os gangliosídios de membrana que permanecem associados à matriz extracelular. Assim, os dissialogangliosídios colocalizaram com integrinas em especializações da membrana plasmática onde as integrinas estão ativadas (pólo anterior de migração). A presença de dissialogangliosídios nas regiões de adesão focal juntamente com β_1 -integrinas suportaria um possível papel modulador dos gangliosídios em relação à função das integrinas. De fato, as células transfectadas com a enzima G_{D3} sintase mostraram-se mais eficientes com relação a estes parâmetros de adesão e migração. A avaliação do nível das integrinas nas diferentes células transfectadas foi necessária. Nós observamos que tanto

quantitativamente como qualitativamente, as integrinas se mostraram bem semelhantes entre os diferentes transfectantes (controle e com a G_{D3} sintase). Desta maneira, as diferenças observadas na capacidade de adesão e/ou migração não são decorrentes de alterações no tipo ou quantidade das moléculas efetoras dos processos de adesão ou migração. Da mesma forma, nos ensaios utilizando o tratamento com PPPP os níveis da β_1 integrina foram avaliados por citometria de fluxo e mostraram-se semelhantes (Figura 12). Atribuímos as diferenças observadas à composição de gangliosídios das células estudadas. Estes resultados nos permitiriam avaliar o papel modulador de gangliosídios sobre a função das integrinas.

A participação de gangliosídios no processo de adesão celular é descrita em alguns trabalhos como agente modulador da função de integrinas e sua afinidade por elementos de matriz extracelular como vitronectina e fibronectina ¹⁶. Avaliamos a adesão dos transfectantes a diferentes elementos de matriz como laminina, fibronectina, vitronectina e colágeno IV. Aos três primeiros elementos testados as células ME-ST8Sial e seus clones aderiram mais que as células ME-pcDNA3 (Figura 13). Em relação ao colágeno IV não houve adesão de nenhum tipo celular testado.

As células G_{D3}^+ migraram mais frente a laminina que as células G_{D3}^- sugerindo que G_{D3} e seu derivado (9-O-acetil- G_{D3}) tenham um possível papel modulador dos gangliosídios das funções de integrinas na frente de migração de células em alguns sistemas biológicos. Recentemente foi mostrado que 9-O-acetil- G_{D3} atua como um importante modulador de

migração de células neuronais e de células da glia. Como em nosso estudo, 9-O-acetil- G_{D3} localiza-se também nas expansões citoplasmáticas associadas à migração celular (como no cone de crescimento de neurônios)

82.

Objetivando a desestruturação das balsas lipídicas, e assim das glicosinapses, o uso de PPPP mostrou-se adequado visto que nos permitiu avaliar a membrana desprovida de glicoesfingolipídios, dentre eles os gangliosídios. Assim temos um painel amplo de combinações de expressão de G_{M3} e G_{D3} . Células ME-pcDNA3 (G_{M3}^+ e G_{D3}^-) e células ME-ST8D4 (G_{M3}^+ e G_{D3}^+) foram convertidas a G_{M3}^- e G_{D3}^- e avaliadas quanto a sua capacidade migratória.

Nestas situações as células $G_{M3}^- G_{D3}^-$ apresentaram-se sempre mais migratórias frente a laminina que as células G_{M3}^+ e G_{D3}^+ , que por sua vez são mais migratórias que as células G_{M3}^+ e G_{D3}^- . Estes resultados sugerem que o gangliosídeo G_{M3} seja inibitório em relação à migração. Esta noção foi sugerida por KAWAKAMI et al.⁵⁹ e ONO et al.⁹² que relatam uma associação de CD9 a balsas lipídicas enriquecidos em G_{M3} ^{59,92}, em uma célula que não sintetiza G_{D3} . G_{M3} , G_{D3} e 9-O-acetil- G_{D3} estariam associados aos microdomínios (balsas lipídicas) especializados da membrana que são considerados estruturas dinâmicas e onde o colesterol desempenha um papel estrutural importante⁷⁸. A retirada de colesterol da membrana não iria alterar a composição de glicoesfingolipídios. Em relação à abordagem utilizando PPPP, é importante lembrar, que além de depletar as membranas celulares de os gangliosídios estávamos depletando-as também de

lactosilceramida da membrana celular. Não há evidências do envolvimento direto de lactosilceramida em migração celular em superfícies de laminina.

Assim, esperávamos que depletando o colesterol e desestruturando estes microdomínios, eliminaríamos as vantagens conferidas pela presença destes gangliosídios na migração, ou desvantagens conferidas por outros. Observamos um consistente aumento de migração frente a laminina nas células ME-ST8D4 tratadas com β -ciclodextrina, que retira o colesterol da membrana (Figura 15). Um aumento semelhante foi observado quando tratamos estas células com PPPP. Além disso, não houve sinergismo com relação a migração quando tiramos o colesterol e os glicosfingolipídios da células simultaneamente. Nós mostramos que a depleção de colesterol ou glicosfingolipídios da membrana celular está associada a um aumento da migração celular nos transfectantes de melan-a.

Assim podemos imaginar dois cenários distintos, embora não excludentes, para interpretar os resultados obtidos até agora: (1) G_{D3} estimula diretamente a migração; (2) G_{M3} age de maneira inibitória e a expressão de G_{D3} sintase, por converter G_{M3} em G_{D3} , diminuiria o efeito inibitório de G_{M3} . Assim expusemos as células ME-pcDNA3 (G_{M3}^+ e G_{D3}^-) tratadas com PPPP (portanto G_{M3}^- e G_{D3}^-), a concentrações crescentes de G_{D3} exógeno e avaliamos o perfil migratório destas células. Observamos que as células expostas a G_{D3} exógeno migraram mais prontamente a laminina que as células não expostas a G_{D3} . Esta diferença deixou de existir quando o ensaio de migração foi realizado em intervalos mais longos (4 horas) (Figura 16).

Para testar a possibilidade inibitória de G_{M3} , nós avaliamos o perfil migratório das células ME-pcDNA3 (G_{M3}^+ e G_{D3}^-) e ME-ST8D4 (G_{M3}^+ e G_{D3}^+) tratadas ou não com PPPP (G_{M3}^- e G_{D3}^-), na presença de G_{M3} exógeno. Em todas as circunstâncias, as células expostas a G_{M3} apresentaram uma redução da capacidade migratória (Figura 17). A ação inibitória da migração de G_{M3} , é independente de G_{D3} , bem como a ação estimulatória de migração de G_{D3} independe de G_{M3} . Mas a alteração no balanço dos dois gangliosídeos após a transfecção de G_{D3} *sintase* favorece a uma maior migração tanto pela diminuição de G_{M3} (inibição) como pela presença de G_{D3} (estímulo).

5.2. REMODELAMENTO DO PERFIL DE GANGLIOSÍDIOS EM TRANSFECTANTES DE TM1 ATRAVÉS DA TRANSFECÇÃO DA G_{D3} SINTASE

A linhagem de melanoma murino, TM1, foi utilizada para ensaios de transfecção heteróloga e estável do gene humano da sialiltransferase ST8Sial. Esta enzima, como já foi dito, converte G_{M3} em G_{D3} . A análise de expressão de gangliosídeos na superfície celular foi verificada através de citometria de fluxo. TM1.ST8 passou a expressar G_{D3} e seu derivado 9-O-acetil- G_{D3} em sua superfície celular enquanto TM1.pcDNA não.

Em nossa primeira transfecção foi observada uma boa expressão do transgene, avaliada pela produção de G_{D3} , mas apesar da presença do antibiótico de seleção (G418), estas células perderam a expressão de G_{D3} após 45 dias da transfecção (Figura 20). Entretanto estas células (TM1)

havia sido utilizadas com sucesso para a transfecção estável para outro gene em nosso laboratório (*LGALS3*, que codifica galectina-3). Neste caso o antibiótico de seleção utilizado também foi G418. Além disto, nós transfectamos novamente melan-a com *G_{D3} sintase* e obtivemos com sucesso a expressão estável de *G_{D3}* ao contrário do que ocorreu em TM1. Posteriormente também constatamos a ausência de *G_{D3}* e/ou 9-O-acetil-*G_{D3}* intracelular pela análise dos extratos lipídicos dos transfectantes de TM1 em ensaios de ELISA (Figura 21).

Outro ponto relevante neste contexto foi o insucesso nas tentativas de transfecção da *G_{D3} sintase* em melanomas murinos B16 F10, também em nosso laboratório (HAN e CHAMMAS, comunicação pessoal). Em melanomas murinos a co-transfecção de *G_{M2}/G_{D2} sintase* e *G_{D3} sintase* favorece a expressão de *G_{D2}*. O acúmulo de *G_{D3}* em vários tipos celulares como células de hepatoma e hepatócitos de rato, neurônios do córtex murinos e oligodendrócitos murinos primários está associado à morte celular, apoptose ^{81,83,109,112}. Em linhagens tumorais linfóide e mielóide humanas, o rápido acúmulo de *G_{D3}* é desencadeado pela interação Fas-FasL ou exposição das ceramidas induzindo diretamente a apoptose ²⁹. Entretanto nestas linhagens a expressão forçada da *G_{D3} sintase* não é suficiente para acionar este mecanismo de apoptose. Em contrapartida quando se suprime o *G_{D3}* endógeno com a utilização de oligonucleotídeos antisense para o gene da *G_{D3} sintase*, há bloqueio substancial da apoptose dependente de Fas ou induzida por ceramida ¹⁰². Nós verificamos que as células melan-a e seus transfectantes de *G_{D3} sintase* apresentam uma

mutação em *TP53*. G_{D3} é um gangliosídeo associado a apoptose, sendo assim, G_{D3} poderia estar funcionando como agente indutor de apoptose nas células TM1 via p53 já que estas células possuem o “status” de *TP53* normal. Ao contrário, em melan-a os mecanismos de apoptose mediados pela proteína p53 estariam inativos.

Avaliamos se em transfecções transientes de *G_{D3} sintase* em TM1 a morte celular seria induzida. Dois ensaios de detecção de morte celular: quantificação de células hipodiplóides com iodeto de propídio e avaliação da dissipação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), avaliada pelo fluorocromo JC1, foram utilizados. Apesar de ter sido observado um efeito de morte celular induzido pela expressão do transgene, este efeito parece associado à eficiência da transfecção e expressão do gene de interesse, o que não é facilmente controlável no sistema utilizado.

Como foi mencionado anteriormente, o acúmulo de G_{D3} é determinante para o desencadeamento da apoptose em alguns tipos celulares. Entretanto, em outros modelos, a expressão forçada da *G_{D3} sintase* não é suficiente para acionar este mecanismo de apoptose. Para G_{D3} desencadear o mecanismo de apoptose nas células TM1.ST8 (G_{M3}^+/G_{D3}^+), seria talvez necessário um estímulo extra e/ou externo? Será que as células TM1 na presença de G_{D3} estariam mais sensíveis a apoptose induzida? A partir destas observações fomos avaliar se os transfectantes com *G_{D3} sintase* seriam mais sensíveis à morte celular induzida por estaurosporina.

Utilizando transfecções transientes, nós observamos diferenças na indução à morte nas células tratadas por estaurosporina na presença de G_{D3}

exógeno somente em três ensaios dentre 8 ensaios. Assim sendo, no modelo de melanoma murino utilizado (TM1), não podemos concluir que G_{D3} esteja atuando em mecanismos que levam a apoptose. O mecanismo da apoptose mediada por G_{D3} ainda não está bem elucidado, além de parecer ser específico para cada modelo celular.

Na literatura, há relatos que mostram que G_{D3} um mediador da resposta apoptótica induzindo a permeabilidade da membrana da mitocôndria, em mitocôndrias isoladas e no contexto celular, em células de hepatoma de rato (MH1C1) ¹⁰⁹. O papel pró-apoptótico de G_{D3} também foi observado em outras linhagens celulares. Como descrito na literatura, linfócitos, neurônios, células musculares cardíacas, célula vascular endotelial mostram-se sensíveis a indução a apoptose via G_{D3} ^{81,83,109,112}. A indução a morte destas células revela algumas semelhanças e diferenças entre si. Nestas linhagens celulares o efeito apoptótico de G_{D3} mostrou-se específico para este gangliosídeo, enquanto a dosagem e a forma de indução a morte celular parece particular de cada um dos sistemas celulares citado. Como exemplo: células musculares cardíacas humanas (H-ASMC), em altas concentrações de G_{D3} , induzem produção de óxido nítrico levando a eventos de sinalização da apoptose ⁹. Mas em células de queratinócitos (SCC12) transfectadas com uma sialidase gangliosídeo-específica, o gangliosídeo G_{D3} facilita a apoptose induzida por estaurosporina, ácido salicílico e deprivação de soro. Neste modelo parece haver outro gangliosídeo envolvido, G_{T1b} , visto que a apoptose em SCC12 é revertida na presença do anticorpo anti- G_{T1b} e

não na presença dos anticorpos anti- G_{D3} e anti- G_{M3} ¹²⁵. Assim o efeito apoptogênico de G_{D3} deve ser ainda alvo de estudo.

O fato de não obtermos a manutenção da expressão de G_{D3} em TM1 após a transfecção com a G_{D3} sintase ainda permanece não esclarecido. A ação da enzima pode estar sendo inativada por mecanismos ainda desconhecidos. RUAN et al.¹⁰⁵ mostraram uma boa correlação entre o nível de mRNA de diferentes glicosiltransferases e sua atividade enzimática em linhagens de melanoma e neuroblastoma. Eles mostraram também que linhagens de neuroblastoma que apresentam altos níveis de G_{D2} , apresentam baixos níveis de G_{D3} e sua sintase. Aparentemente há um equilíbrio dinâmico entre as enzimas deste dois gangliosídios. Uma linhagem de neuroblastoma (SH-SY5Y), que apresenta baixos níveis de G_{D2} e G_{D3} , foi transfectadas com a G_{D3} sintase. Após a transfecção SH-SY5Y passou a acumular altos níveis de G_{D2} e G_{D3} em baixos níveis. A presença de G_{M2}/G_{D2} sintase parece favorecer a manutenção da presença de G_{D3} já que a co-transfecção destas duas enzimas em melanomas murinos são suficientes para a obtenção da expressão de G_{D3} ⁴.

Nós avaliamos o perfil de mRNA das enzimas, G_{M2}/G_{D2} sintase e G_{D3} sintase, nas células TM1 transfectada com G_{D3} sintase. Para assim podermos acrescentar mais elementos na tentativa de esclarecer o porque da não manutenção de G_{D3} nos transfectantes (TM1). O mRNA de G_{D3} sintase utilizado para a transfecção é humano, como os iniciadores desenhados, assim somente aquelas células que foram transfectadas com a construção pcDNA3 + G_{D3} sintase poderão expressar o mensageiro da

enzima. Já para G_{M2}/G_{D2} sintase isto não ocorre, a expressão pode ser induzida naturalmente, ou seja, sem manipulação gênica. TM1 originalmente não expressa G_{M2}/G_{D2} sintase.

Após a transfecção, talvez os estímulos originados no processo de transfecção e/ou seleção do antibiótico pudessem explicar o aumento de expressão desta enzima nos transfectantes de TM1 com plasmídeo vazio. ME-ST8D4 e TM1.ST8 expressam tanto G_{D3} sintase quanto G_{M2}/G_{D2} sintase. Mas TM1.pcDNA3 expressa somente G_{M2}/G_{D2} sintase ao contrário de ME-pcDNA3 que não expressa nenhuma das duas. A G_{M2}/G_{D2} sintase pode usar G_{D3} como substrato para acúmulo de G_{D2} nas células TM1 transfectadas. Este processo pode não estar ativo nos transfectantes de melan-a e por isso o sucesso na manutenção da presença de G_{D3} . Lembramos que TM1 naturalmente não expressa nenhuma das enzimas. Em TM1.ST8 apesar da expressão heteróloga de G_{D3} sintase, há também a expressão da G_{M2}/G_{D2} sintase endógena. O que controla a transcrição destes genes ainda está em debate. É interessante observar que foi possível identificar *in silico* um elemento responsivo a p53 no gene da G_{M2}/G_{D2} sintase. Este elemento está ausente no gene da G_{D3} sintase. Especulamos que ativação transcricional da G_{M2}/G_{D2} sintase depende da integridade de p53. Como mostramos que TP53 é normal quanto aos exons 5-8 em TM1, mas apresenta uma mutação em melan-a, é possível que o insucesso em obter uma linhagem de melanoma murino derivada da TM1 (ou mesmo B16-F10) esteja associado ao fato de nestas células haver a conversão de G_{D3} em G_{D2} . Análises

imunoquímicas serão realizadas para determinar o efetivo acúmulo de G_{D2} nestas células.

As células TM1 transfectantes, possivelmente apresentam como gangliosídios principais: G_{M3} , em TM1 parental, não há atividade transcricional da enzima G_{M2}/G_{D2} sintase; G_{M2} em TM1.pcDNA3, devido a atividade transcricional endógena de G_{M2}/G_{D2} sintase; e G_{D2} , em TM1.ST8, devido a atividade transcricional endógena de G_{M2}/G_{D2} sintase, além da expressão forçada de G_{D3} sintase. Os níveis de G_{M3} foram diminuídos em ambos transfectantes de TM1. Apesar de TM1.pcDNA3 e TM1.ST8 mostrarem um perfil de gangliosídios potencialmente diferentes entre si, nós não observamos diferenças no tempo de duplicações celular e na tumorigênese *in vivo* dos diferentes transfectantes. É válido lembrar que G_{D2} somente está presente em melanomas metastáticos. Os transfectantes da G_{D3} sintase em TM1 mostram-se um bom modelo de estudo para gangliosídios em funções como apoptose e migração, e ainda deverão ser explorados em outros sistemas em desenvolvimento no nosso laboratório.

5.3. ANÁLISE DO GENE *TP53* EM MELAN-A, ME-PCDNA3, ME-ST8SIAL E TM1

Nós analisamos os exons 5 a 8 (códon 126-306) de *TP53*. Estas regiões representam 95% das mutações descritas para *TP53* e mutações nesta região estão relacionadas à disfunção deste gene. Somente em melan-a e seus transfectantes ME-pcDNA3 e ME-ST8Sial foi encontrada um

mutação tipo missense no exon 5 trocando uma histidina por um ácido aspártico no códon 175 (175^{ASP}) que também é observada em tumores humanos (Figura 26). G_{D3} é um gangliosídeo associado a apoptose em algumas linhagens celulares, assim sendo a mutação em *TP53* poderia favorecer a sobrevivência da linhagem melan-a na presença de G_{D3} endógeno quando transfectamos *G_{D3} sintase* neste sistema, gerando ME-ST8Sial. Em contrapartida TM1 possui o “status” normal de *TP53* e quando transfectamos *G_{D3} sintase*, a presença de G_{D3} seria letal para estas células, levando-as a apoptose.

Como mencionado na introdução, melanomas freqüentemente não apresentam alterações físicas no gene *TP53*. O sequenciamento deste gene mostrou-nos que a população de células da linhagem melan-a é heterogênea, apresentando clones que apresentam mutações neste gene e outros clones que não apresentam esta mutação. De alguma forma, a seleção por crescimento independente de ancoragem que levou ao isolamento das linhagens tumorigênicas favoreceu a expansão de células que tivessem o “status” de p53 normal. Podemos especular que esta seleção tenha favorecido as células que mantivessem uma estabilidade genômica maior, o que deve acontecer preferencialmente na presença de p53 funcional. Este fato também ocorre em melanomas humanos, onde p53 também é potencialmente funcional. Aí, o que freqüentemente ocorre é o silenciamento de genes que controlam a função de p53 como aqueles codificados pelo *locus* de *CDKN2A*. De fato, sabemos que em TM1 não há a expressão dos genes codificados por este *locus*, por mecanismos que

dependem do silenciamento transcricional dependente de metilação da cromatina (TEIXEIRA e CHAMMAS, comunicação pessoal). De qualquer forma, nestas células, e não em melan-a, parece haver indução da expressão da G_{M2}/G_{D2} sintase, que levaria à extensão do remodelamento dos disialogangliosídios nestas linhagens. A presença física do produto da enzima precisa ainda ser determinada; uma vez presente, o modelo aqui gerado se prestará a estudos do papel desta segunda classe de disialogangliosídios na progressão de melanomas.

O controle transcricional da enzima merece ainda maior estudo. O fato de termos identificado uma região responsiva a p53 no gene da G_{M2}/G_{D2} sintase, mas não da G_{D3} sintase é interessante e poderia explicar parte dos achados que relatamos nesta tese.

Várias alterações em funções biológicas são necessárias para que ocorra a tumorigênese e a progressão tumoral. Os gangliosídios, especialmente os disialogangliosídios parecem modular pontos chaves, em alguns modelos, de vias importantes como, proliferação, migração e morte celular. G_{D3} e G_{D2} , vêm sendo associados a melanomas agressivos e metastáticos. Em nosso estudo, nós mostramos que a superexpressão de G_{D3} em células de melanócitos, melan-a, confere a estas vantagens seletivas com relação a adesão a diferentes substratos e migração frente a laminina. Estes dados sugerem uma modulação de β_1 integrinas por G_{D3} . G_{D3} , vêm sendo associado a morte celular em alguns sistemas bem específicos. E isto talvez seja a explicação para a aparente ineficiência na geração de transfectantes estáveis de TM1. Estas células mantêm o

mensageiro heterólogo de G_{D3} sintase, mas não acumula G_{D3} . Talvez, como uma via de escape, as células que permanecem viáveis, fazem-no por expressar G_{M2}/G_{D2} sintase e provavelmente acumular G_{D2} , que não é apoptogênico.

Embora os mecanismos precisos de como gangliosídeos possam interferir na função de moléculas como integrinas ainda não estejam claros, parece-nos claro que a composição dos glicosfingolipídios de uma célula, e por conseguinte dos microdomínios da membrana plasmática possa ser um elemento chave na transdução de sinal que leva à resposta de adesão ou migração celular. Em modelos de células tumorais, este equilíbrio pode ser determinante para o caráter migratório de uma célula. O fato de gangliosídeos serem liberados da superfície celular e poderem particionar em células que necessariamente não expressam os genes de biossíntese destes glicosfingolipídios, controlando funções como adesão, migração e morte celular tem múltiplas implicações para a progressão dos tumores e mesmo nas interações entre células do hospedeiro e as células tumorais. O advento de inibidores metabólicos da síntese destes glicosfingolipídios poderá ser uma plataforma para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para tumores, que poderiam ser utilizados para evitar-se a imunossupressão observada em alguns pacientes, como os portadores de melanoma, por exemplo; ou então como modificadores de resposta a drogas indutoras de morte celular. Os sistemas celulares gerados neste trabalho estão sendo utilizados com este propósito.

6. CONCLUSÕES

1. A transfecção de *GD3 sintase* está associada a um aumento de migração na linhagem de melanócitos murino (melan-a), este aumento é observado sem flutuação nos níveis de integrinas;
3. GM3 e GD3 modulam antagonicamente a migração celular e esta modulação é dependente da integridade dos microdomínios ricos em colesterol (balsas lipídicas);
4. Os transfectantes de TM1 com *GD3 sintase* perdeu a expressão GD3 e seus derivados após alguns dias de seleção clonal com G418. Estes transfectantes passaram a expressar a enzima *GM2/GD2 sintase*, esta enzima converte GM3 em GM2 e GD3 em GD2. A ausência de GD3 e a expressão de *GM2/GD2 sintase* podem estar associadas a um mecanismo de sobrevivência de células tumorais;
5. Melan-a, ME-pcDNA3 e ME-ST8Sial, e não TM1, apresentam mutação na região codificadora do gene *TP53*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 Andersen K, Nesland JM, Holm R, Florenes VA, Fodstad O, Maelandsmo GM. Expression of S100A4 combined with reduced E-cadherin expression predicts patient outcome in malignant melanoma **Mod Pathol** 2004; 17:990-7.
- 2 Aoki H, Satoh M, Mitsuzuka K, et al. Inhibition of motility and invasiveness of renal cell carcinoma induced by short interfering RNA transfection of beta 14GalNAc transferase. **FEBS Lett** 2004;567:203-8.
- 3 Ausubel R, Brent R, Kingston RE, et al.. Short protocols in molecular biology 3^a ed ed 1995
- 4 Becker JC, Varki N, Gillies SD, Furukawa K, Reisfeld RA. An antibody-interleukin 2 fusion protein overcomes tumor heterogeneity by induction of a cellular immune response **Proc Natl Acad Sci USA** 1996; 93:7826-31.
- 5 Bennett DC. Human melanocyte senescence and melanoma susceptibility genes. **Oncogene** 2003; 22:3063-9.
- 6 Bennett DC, Cooper PJ, Hart IR. A line of non-tumorigenic mouse melanocytes syngeneic with the B16 melanoma and requiring a tumour promoter for growth. **Int J Cancer** 1987; 39:414-8.
- 7 Berditchevski F, Gilbert E, Griffiths MR, Fitter S, Ashman L, Jenner SJ. Analysis of the CD151 center dot alpha(3)beta(1) integrin and CD151 center dot tetraspanin interactions by mutagenesis. **J Biol Chem** 2001; 276:41165-74.

- 8 Berditchevski F, Odintsova E. Characterization of integrin-tetraspanin adhesion complexes: Role of tetraspanins in integrin signaling. **J Cell Biol** 1999; 146:477-92.
- 9 Bhunia AK, Schwarzmann G, Chatterjee S. GD3 recruits reactive oxygen species to induce cell proliferation and apoptosis in human aortic smooth muscle cells. **J BiolChem** 2002; 277:16396-402.
- 10 Bieberich E, MacKinnon S, Silva J, et al. Regulation of ganglioside biosynthesis by enzyme complex formation of glycosyltransferases **Biochemistry** 2002; 41:11479-87.
- 11 Birkle S, Gao L, Zeng G, Yu RK. Down-regulation of GD3 ganglioside and its O-acetylated derivative by stable transfection with antisense vector against GD3-synthase gene expression in hamster melanoma cells: effects on cellular growth melanogenesis and dendricity. **J Neurochem** 2000; 74:547-54.
- 12 Birkle S, Zeng G, Gao L, Yu RK, Aubry J. Role of tumor-associated gangliosides in cancer progression. **Biochimie** 2003; 85:455-63.
- 13 Birnboim HC, Doly J. Rapid Alkaline Extraction Procedure for Screening Recombinant Plasmid. **DNA Nucl Ac Res** 1979; 7:1513-23.
- 14 Blum AS, Barnstable CJ. O-acetylation of a cell-surface carbohydrate creates discrete molecular patterns during neural development. **Proc Natl Acad Sci USA** 1987; 84:8716-20.
- 15 Brose MS, Volpe P, Feldman M, et al. BRAF and RAS mutations in human lung cancer and melanoma. **Cancer Res** 2002; 62:6997-7000.

- 16 Calderwood DA, Shattil SJ, Ginsberg MH. Integrins and actin filaments: reciprocal regulation of cell adhesion and signaling. **J Biol Chem** 2000; 275:22607-10.
- 17 Carubia JM, Yu RK, Macala LJ, Kirkwood JM, Varga JM. Gangliosides of normal and neoplastic human melanocytes. **Biochem Bioph Res Com** 1984; 120:500-4.
- 18 Chammas C, Duarte APM, Otake AH, Costa M. Genética e Biologia Molecular do Melanoma e de sua Progressão *In* Oliveira Filho RS (ed), Melanoma Citâneo Localizado e Linfonodo Sentinela 2003; pp 1-19. São Paulo.
- 19 Chammas R, Sonnenburg JL, Watson NE et al. De-N-acetyl-gangliosides in humans: unusual subcellular distribution of a novel tumor antigen. **Cancer Res** 1999; 59:1337-46.
- 20 Chen HH, Fukumoto S, Furukawa K, et al. Suppression of lung metastasis of mouse Lewis lung cancer P29 with transfection of the ganglioside GM(2)/GD(2) synthase gene. **Int J Cancer** 2003; 103:169-76.
- 21 Chen HY, Varki A. O-acetylation of GD3: An enigmatic modification regulating apoptosis? **J Exp Med** 2002; 196:1529-33.
- 22 Cheresch DA, Harper JR, Schulz G, Reisfeld RA. Localization of the gangliosides Gd2 and Gd3 in adhesion plaques and on the surface of human-melanoma cells. **Proc Natl Acad Sci USA** 1984; 81:5767-71.
- 23 Cheresch DA, Pierschbacher MD, Herzig MA, Mujoo K. Disialogangliosides GD2 and GD3 are involved in the attachment of human melanoma and neuroblastoma cells to extracellular matrix proteins. **J Cell Biol** 1986; 102:688-96.

- 24 Cheresh DA, Reisfeld RA, Varki AP. O-Acetylation of disialoganglioside-Gd3 by human-melanoma cells creates a unique antigenic determinant **Science** 1984; 225:844-6.
- 25 Colell A, Garcia-Ruiz C, Mari M, Fernandez-Checa JC. Mitochondrial permeability transition induced by reactive oxygen species is independent of cholesterol-regulated membrane fluidity. **Febs Lett** 2004; 560:63-8.
- 26 Correa M, Machado Jr J, Carneiro CRW, et al. Transient inflammatory response induced by apoptotic cells is an important mediator of melanoma cell engraftment and growth. **Int J Cancer** 2004 in press.
- 27 Dai DL, Martinka M, Bush JA, Li G, Reduced Apaf-1 expression in human cutaneous melanomas **Br J Cancer** 2004 10 Aug. [Epub ahead of print].
- 28 Dall'Olio F, Chiricolo M. Sialyltransferases in cancer **Glycoconj J** 2001; 18:841-50.
- 29 De Maria R. Requirement for GD3 ganglioside in CD95-and ceramide-induced apoptosis. 1998; **Science** 280:363.
- 30 Demetriou M, Nabi IR, Coppolino M, Dedhar S, Dennis JW. Reduced contact-inhibition and substratum adhesion in epithelial cells expressing GlcNAc-transferase V. **J Cell Biol** 1995; 130:383-92.
- 31 Deng W, Li R, Guerrero M, Liu Y, Ladisch S. Transfection of glucosylceramide synthase antisense inhibits mouse melanoma formation. **Glycobiology** 2002; 12:145-52.
- 32 Dippold WG, Dienes HP, Knuth A, Zumbuschenfelde KHM. Immunohistochemical localization of ganglioside-Gd3 in human-

- malignant melanoma epithelial tumors and normal-tissues. **Cancer Res** 1985; 45:3699-705.
- 33 Dupin E, Le Douarin, N M. Development of melanocyte precursors from the vertebrate neural crest. **Oncogene** 2003; 22:3016-23.
- 34 Elder DE, Clark WH, Jr, Elenitsas R, Guerry D, Halpern AC. The early and intermediate precursor lesions of tumor progression in the melanocytic system: common acquired nevi and atypical (dysplastic) nevi. **Semin Diagn Pathol** 1993; 10:18-35.
- 35 Eskandarpour M, Hashemi J, Kanter L, Ringborg U, Platz A, Hansson J. Frequency of UV-inducible NRAS mutations in melanomas of patients with germline CDKN2A mutations. **J Nat Cancer Inst** 2003; 95:790-8.
- 36 Furukawa K, Akagi T, Nagata Y, et al. GD2 ganglioside on human T-lymphotropic virus type I-infected T cells: possible activation of beta-14-N-acetylgalactosaminyltransferase gene by p40tax. **Proc Natl Acad Sci USA** 1993; 90:1972-6.
- 37 Furukawa K, Horie M, Okutomi K, Sugano S, Furukawa K. Isolation and functional analysis of the melanoma specific promoter region of human GD3 synthase gene. **Biochim Biophys acta** 2003;627:71-78.
- 38 Furukawa K, Soejima H, Niikawa N, Shiku H, Furukawa K. Genomic organization and chromosomal assignment of the human beta-14-N-acetylgalactosaminyltransferase gene. Identification of multiple transcription units. **J Biol Chem** 1996; 271:20836-44.
- 39 Furukawa K, Takamiya K, Furukawa K. Beta14-N-acetylgalactosaminyltransferase--GM2/GD2 synthase: a key enzyme

- to control the synthesis of brain-enriched complex gangliosides. **Biochim Biophys Acta** 2002; 1573:356-62.
- 40 Garcia-Ruiz C, Colell A, Paris R, Fernandez-Checa JC. Direct interaction of GD3 ganglioside with mitochondria generates reactive oxygen species followed by mitochondrial permeability transition cytochrome c release and caspase activation. **Faseb J** 2000; 14:847-58.
- 41 Gomez-Mouton C, Abad JL, Mira E, et al. Segregation of leading-edge and uropod components into specific lipid rafts during T cell polarization. **Proc Natl Acad Sci USA** 2001; 98:9642-7.
- 42 Grillo G, Licciulli F, Liuni S, Sbisa E, Pesole G. PatSearch: A program for the detection of patterns and structural motifs in nucleotide sequences. **Nucleic Acids Res** 2003; 31:3608-12.
- 43 Ha KT, Lee YC, Kim CH. Overexpression of GD3 synthase induces apoptosis of vascular endothelial ECV304 cells through downregulation of Bcl-2. **Febs Lett** 2004; 568:183-7.
- 44 Hakomori S. Traveling for the glycosphingolipid path. **Glycoconj J** 2000; 17:627-47.
- 45 Hakomori S. The glycosynapse. **Proc Natl Acad Sci USA** 2002; 99:225-32.
- 46 Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. **Cell** 2000; 100:57-70.
- 47 Hannun YA, Bell RM. Functions of sphingolipids and sphingolipid breakdown products in cellular-regulation. **Science** 1989; 243:500-7.

- 48 Haraguchi M, Yamashiro S, Yamamoto A, et al. Isolation of GD3 synthase gene by expression cloning of GM3 alpha-28-sialyltransferase cDNA using anti-GD2 monoclonal antibody **Proc Natl Acad Sci USA** 1994; 91:10455-9.
- 49 Harder T, Simons K. Caveolae DIGs and the dynamics of sphingolipid-cholesterol microdomains. **Curr Opin Cell Biol** 1997; 9:534-42.
- 50 Harduin-Lepers A, Recchi MA, Delannoy P. 1994 the year of sialyltransferases. **Glycobiology** 1995; 5:741-58.
- 51 Hoh J, Jin S, Parrado T, Edington J, Levine AJ, Ott J. The p53MH algorithm and its application in detecting p53-responsive genes. **Proc Natl Acad Sci USA** 2002; 99:8467-72.
- 52 Houghton AN, Polsky D. Focus on melanoma. **Cancer Cell** 2002; 2:275-8.
- 53 Hsu MY, Meier FE, Nesbit M, et al. E-cadherin expression in melanoma cells restores keratinocyte-mediated growth control and down-regulates expression of invasion-related adhesion receptors **Am J Pathol** 2000; 156:1515-25.
- 54 Ichikawa S, Nakajo N, Sakiyama H, Hirabayashi Y. A mouse B16 melanoma mutant deficient in glycolipids. **Proc Natl Acad Sci USA** 1994; 91:2703-7.
- 55 Inokuchi J, Kabayama K, Uemura S, Igarashi Y. Glycosphingolipids govern gene expression. **Glycoconj J** 2004; 20:169-78.
- 56 Iwabuchi K, Handa K, Hakomori S. Separation of "glycosphingolipid signaling domain" from caveolin-containing membrane fraction in

- mouse melanoma B16 cells and its role in cell adhesion coupled with signaling. **J Biol Chem** 1998; 273:33766-73.
- 57 Kannan K, Sharpless NE, Xu J, O'Hagan RC, Bosenberg M, Chin L. Components of the Rb pathway are critical targets of UV mutagenesis in a murine melanoma model. **Proc Natl Acad Sci USA** 2003; 100:1221-5.
- 58 Kasahara K, Watanabe Y, Yamamoto T, Sanai Y. Association of Src family tyrosine kinase Lyn with ganglioside G(D3) in rat brain - Possible regulation of Lyn by glycosphingolipid in caveolae-like domains. **J Biol Chem** 1997; 272:29947-53.
- 59 Kawakami Y, Kawakami K, Steelant WFA, et al. Tetraspanin CD9 is a "proteolipid" and its interaction with alpha(3) integrin in microdomain is promoted by GM3 ganglioside leading to inhibition of laminin-5-dependent cell motility. **J Biol Chem** 2002; 277:34349-58.
- 60 Kazarian T, Jabbar AA, Wen FQ, Patel DA, Valentino LA. Gangliosides regulate tumor cell adhesion to collagen. **Clin Exp Metastasis** 2003; 20:311-9.
- 61 Kazui A, Ono M, Handa K, Hakomori S. Glycosylation affects translocation of integrin Src and caveolin into or out of GEM. **Biochem Biophys Res Commun** 2000; 273: 159-63.
- 62 Koh Y, Tsunoda T, Iwahashi M, et al. Decreased expression of alpha28 sialyltransferase and increased expression of beta14 N-acetylgalactosaminyltransferase in gastrointestinal cancers. **Exp Biol Med(Maywood)** 2002; 227:196-200.

- 63 Koistinen P, Ahonen M, Kahari VM, Heino J. alphaV integrin promotes in vitro and in vivo survival of cells in metastatic melanoma. **Int J Cancer** 2004; 112:61-70.
- 64 Kotani M, Ozawa H, Kawashima I, Ando S, Tai T. Generation of one set of monoclonal antibodies specific for a-pathway ganglio-series gangliosides. **Biochim Biophys Acta** 1992; 1117:97-103.
- 65 Kwiatkowska K, Sobota A. The clustered Fc gamma receptor II is recruited to Lyn-containing membrane domains and undergoes phosphorylation in a cholesterol-dependent manner European. **J Immunology** 2001; 31:989-98.
- 66 Labrousse AL, Ntayi C, Hornebeck W, Bernard P. Stromal reaction in cutaneous melanoma. **Crit Rev Oncol Hematol** 2004; 49:269-75.
- 67 Lang Z, Guerrera M, Li R, Ladisch S. Ganglioside GD1a enhances VEGF-induced endothelial cell proliferation and migration **Biochem Biophys Res Commun** 2001;282:1031-7.
- 68 Lee L, Abe A, Shayman JA. Improved inhibitors of glucosylceramide synthase. **J Biol Chem** 1999; 274:14662-9.
- 69 Leiter U, Schmid RM, Kaskel P, Peter RU, Krahn G. Antiapoptotic bcl-2 and bcl-xL in advanced malignant melanoma. **Arch Dermatol Res** 2000; 292:225-32.
- 70 Li G, Herlyn M. Dynamics of intercellular communication during melanoma development. **Mol MedToday** 2000; 6:163-9.
- 71 Li RX, Liu YH, Ladisch S. Enhancement of epidermal growth factor signaling and activation of src kinase by gangliosides **J Biol Chem** 2001; 276:42782-92.

- 72 Liang X, Nazarian A, Erdjument-Bromage H, Bornmann W, Tempst P, Resh MD. Heterogeneous fatty acylation of Src family kinases with polyunsaturated fatty acids regulates raft localization and signal transduction. **J Biol Chem** 2001; 276:30987-94.
- 73 Liour, SS, Yu, RK. Differential effects of three inhibitors of glycosphingolipid biosynthesis on neuronal differentiation of embryonal carcinoma stem cells. **Neurochem Res** 2002; 27: 1507-1512.
- 74 Longo N, Yanez-Mo M, Mittelbrunn M, et al. Regulatory role of tetraspanin CD9 in tumor-endothelial cell interaction during transendothelial invasion of melanoma cells. **Blood** 2001; 98:3717-26.
- 75 Ma R, Koulov A, Moulton C, et al. Apoptosis of human breast carcinoma cells in the presence of disialosyl gangliosides: II treatment of SKBR3 cells with GD3 and GD1b gangliosides. **Glycoconj J** 2003; 20:319-30.
- 76 Maccioni HJ, Giraud CG, Daniotti JL. Understanding the stepwise synthesis of glycolipids. **Neurochem Res** 2002;27:629-36
- 77 Malisan F, Franchi L, Tomassini B, et al. Acetylation suppresses the proapoptotic activity of GD3 ganglioside. **J Exp Med** 2002; 196:1535-41.
- 78 Manes S, Martinez A. Cholesterol domains regulate the actin cytoskeleton at the leading edge of moving cells. **Trends Cell Biol** 2004; 14:275-8.
- 79 Matter ML, Ruoslahti E. A signaling pathway from the alpha(5)beta 1 and alpha(v)beta(3) integrins that elevates bcl-2 transcription. **J Biol Chem** 2001; 276:27757-63.

- 80 Meier F, Nesbit M, Hsu MY, et al. Human melanoma progression in skin reconstructs - Biological significance of bFGF American. **J Pathol** 2000; 156:193-200.
- 81 Melchiorri D, Martini F, Lococo E, et al. An early increase in the disialoganglioside GD3 contributes to the development of neuronal apoptosis in culture. **Cell Death Differentiation** 2002; 9:609-15.
- 82 Mendez-Otero R, Santiago MF. Functional role of a specific ganglioside in neuronal migration and neurite outgrowth. **Braz J Med Biol Res** 2003; 36:1003-13.
- 83 Moon SK, Kim HM, Lee YC, Kim CH. Disialoganglioside (GD3) synthase gene expression suppresses vascular smooth muscle cell responses via the inhibition of ERK1/2 phosphorylation cell cycle progression and matrix metalloproteinase-9 expression. **J Biol Chem** 2004; 279:33063-70.
- 84 Moseley GW, Elliott J, Wright MD, Partridge LJ, Monk PN. Interspecies contamination of the KM3 cell line: Implications for CD63 function in melanoma metastasis. **Int JCancer** 2003; 105:613-6.
- 85 Nakano J, Raj BK, Asagami C, Lloyd KO. Human melanoma cell lines deficient in GD3 ganglioside expression exhibit altered growth and tumorigenic characteristics **J Invest Dermatol** 1996; 107:543-8.
- 86 Nara K, Watanabe Y, Maruyama K, Kasahara K, Nagai Y, Sanai Y. Expression cloning of A Cmp-Neuac-Neuac-Alpha-2-3Gal-Beta-1-4Glc-Beta-1-1'Cer Alpha-28-Sialyltransferase (Gd3 Synthase) from human-melanoma cells. **Proc Natl Acad Sci USA** 1994; 91:7952-6.

- 87 Nikkola J, Vihinen P, Vlaykova T, Hahka-Kemppinen M, Heino J, Pyrhonen S. Integrin chains beta 1 and alpha v as prognostic factors in human metastatic melanoma. **Melanoma Res** 2004; 14:29-37.
- 88 Ntayi C, Hornebeck W, Bernard P. [Involvement of matrix metalloproteinases (MMPs) in cutaneous melanoma progression]. **PatholBiol (Paris)** 2004; 52:154-9.
- 89 Okada M, Itoh M, Haraguchi M, et al. B-series ganglioside deficiency exhibits no definite changes in the neurogenesis and the sensitivity to Fas-mediated apoptosis but impairs regeneration of the lesioned hypoglossal nerve. **J Biol Chem** 2002; 277:1633-6.
- 90 Olshefski R, Ladisch S. Synthesis shedding and intercellular transfer of human medulloblastoma gangliosides: abrogation by a new inhibitor of glucosylceramide synthase. **J Neurochem** 1998; 70:467-72.
- 91 Ono M, Hakomori S. Glycosylation defining cancer cell motility and invasiveness. **Glycoconj J** 2003; 20:71-8.
- 92 Ono M, Handa K, Sonnino S, Withers DA, Nagai H, Hakomori S. GM3 ganglioside inhibits CD9-facilitated haptotactic cell motility: Coexpression of GM3 and CD9 is essential in the downregulation of tumor cell motility and malignancy. **Biochemistry** 2001; 40:6414-21.
- 93 Ono M, Handa K, Withers DA, Hakomori SI. Glycosylation effect on membrane domain (GEM) involved in cell adhesion and motility: A preliminary note on functional alpha 3 alpha 5-CD82 glycosylation complex in Id1D 14 cells. **Biochem Biophys Res Commun** 2000; 279:744-50.
- 94 Ostermeyer AG, Beckrich BT, Ivanson KA, Grove KE, Brown DA. Glycosphingolipids are not essential for formation of detergent-

- resistant membrane rafts in melanoma cells - Methyl-beta-cyclodextrin does not affect cell surface transport of a GPI-anchored protein. **J Biol Chem** 1999; 274: 34459-66.
- 95 Palazzo AF, Eng CH, Schlaepfer DD, Marcantonio EE, Gundersen GG. Localized stabilization of microtubules by integrin - and FAK-facilitated Rho signaling. **Science** 2004; 303:836-39.
- 96 Pande G. The role of membrane lipids in regulation of integrin functions. **Curr Opin Cell Biol** 2000; 12:569-74.
- 97 Peguet-Navarro J, Sportouch M, Popa I, Berthier O, Schmitt D, Portoukalian J. Gangliosides from human melanoma tumors impair dendritic cell differentiation from monocytes and induce their apoptosis. **J Immunol** 2003; 170:3488-94.
- 98 Pilkington CJ. The role of the extracellular matrix in neoplastic glial invasion of the nervous system, **Braz J Med Biol Res** 1996;29:1159-72
- 99 Pukel CS, Lloyd KO, Travassos LR, Dippold WG, Oettgen HF, Old LJ. GD3 a prominent ganglioside of human melanoma Detection and characterisation by mouse monoclonal antibody. **J Exp Med** 1982; 155:1133-47.
- 100 Rademacher TW, Parekh R B, Dwek RA. Glycobiology **Ann Rev Bioch** 1988; 57:785-838.
- 101 Reers M, Smith TW, Chen LB. J-aggregate formation of a carbocyanine as a quantitative fluorescent indicator of membrane potential. **Biochemistry** 1991; 30:4480-6.

- 102 Reynolds CP, Maurer BJ, Kolesnick RN. Ceramide synthesis and metabolism as a target for cancer therapy. **Cancer Lett** 2004; 206:169-80.
- 103 Rippo MR, Malisan F, Ravagnan L, et al. GD3 ganglioside directly targets mitochondria in a bcl-2-controlled fashion. **Faseb J** 2000; 14: 2047-54.
- 104 Ruan S, Lloyd KO. Glycosylation pathways in the biosynthesis of gangliosides in melanoma and neuroblastoma cells: relative glycosyltransferase levels determine ganglioside patterns. **Cancer Res** 1992; 52:5725-31.
- 105 Ruan ST, Raj BKM, Lloyd KO. Relationship of glycosyltransferases and mRNA levels to ganglioside expression in neuroblastoma and melanoma cells. **J Neurochem** 1999; 72: 514-21.
- 106 Rusnati M, Tanghetti E, Urbinati C, et al. Interaction of fibroblast growth factor-2 (FGF-2) with free gangliosides: biochemical characterization and biological consequences in endothelial cell cultures. **Mol Biol Cell** 1999; 10:313-27.
- 107 Sandhoff K, Kolter T. Biosynthesis and degradation of mammalian glycosphingolipids. **Phil Trans R Soc Lond B Biol Sci** 2003;358:847-61.
- 108 Sango K, Johnson ON, Kozak CA, Proia RL. Beta-14-N-acetylgalactosaminyltransferase involved in ganglioside synthesis - cDNA sequence expression and chromosome mapping of the mouse gene. **Genomics** 1995; 27:362-5.
- 109 Scorrano L, Petronilli V, Di Lisa F, Bernardi P. Commitment to apoptosis by GD3 ganglioside depends on opening of the

- mitochondrial permeability transition pore. **J Biol Chem** 1999; 274:22581-5.
- 110 Shi WX, Chammas R, Varki A. Regulation of sialic acid 9-O-acetylation during the growth and differentiation of murine erythroleukemia cells. **J Biol Chem** 1996; 271:31517-25.
- 111 Silletti S, Kessler T, Goldberg J, Boger DL, Cheresh DA. Disruption of matrix metalloproteinase 2 binding to integrin $\alpha(v)\beta(3)$ by an organic molecule inhibits angiogenesis and tumor growth in vivo. **Proc Natl Acad Sci USA** 2001; 98:119-24.
- 112 Simon BM, Malisan F, Testi R, Nicotera P, Leist M. Disialoganglioside GD3 is released by microglia and induces oligodendrocyte apoptosis. **Cell Death Diff** 2002; 9: 758-67.
- 113 Simons K, Ikonen E. Functional rafts in cell membranes. **Nature** 1997; 387:569-72.
- 114 Soengas MS, Capodiceci P, Polsky D, et al. Inactivation of the apoptosis effector Apaf-1 in malignant melanoma. **Nature** 2001; 409:207-11.
- 115 Sorice M, Longo A, Garofalo T, Mattei V, Misasi R, Pavan A. Role of GM3-enriched microdomains in signal transduction regulation in T lymphocytes. **Glycoconj J** 2004,20: 63-70.
- 116 Stahl JM, Cheung M, Sharma A, Trivedi NR, Shanmugam S, Robertson GP. Loss of PTEN promotes tumor development in malignant melanoma. **Cancer Res** 2003; 63:2881-90.
- 117 Sun P, Wang XQ, Lopatka K, Bangash S, Paller AS. Ganglioside loss promotes survival primarily by activating integrin-linked Kinase/Akt

- without phosphoinositide 3-OH kinase signaling. **J Invest Dermatol** 2002;119:107-17.
- 118 Svennerholm L. Chromatographic separation of human brain gangliosides. **J Neurochem** 1963; 10:613-23.
- 119 Sviderskaya EV, Gray-Schopfer VC, Hill SP, et al. p16/cyclin-dependent kinase inhibitor 2A deficiency in human melanocyte senescence apoptosis and immortalization: possible implications for melanoma progression. **J Natl Cancer Inst** 2003; 95:723-32.
- 120 Tam AS, Foley JF, Devereux TR, Maronpot RR, Massey TE. High frequency and heterogeneous distribution of p53 mutations in aflatoxin B-1-induced mouse lung tumors. **Cancer Res** 1999; 59:3634-40.
- 121 Tomassini B, Testi R. Mitochondria as sensors of sphingolipids **Biochimie** 2002; 84:123-9.
- 122 Tsuji S. Molecular cloning and functional analysis of sialyltransferases. **J Biochem** 1996;120:1-13.
- 123 Varki A, Cummings R, Esko J, Freeze H, Hart G, Marth J. **Essentials of glycobiology**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1999.
- 124 Wang X Q Sun P Al Qamari A Tai T Kawashima I and Paller A S Carbohydrate-carbohydrate binding of ganglioside to integrin alpha(5) modulates alpha(5)beta(1) function **J Biol Chem** 276: 8436-8444 2001.
- 125 Wang XQ, Sun P, Paller AS. Inhibition of integrin-linked kinase/protein kinase B/Akt signaling - Mechanism for ganglioside-induced apoptosis. **J Biol Chem** 2001; 276:44504-11.

- 126 Wang XQ, Sun P, Paller AS. Ganglioside GM3 blocks the activation of epidermal growth factor receptor induced by integrin at specific tyrosine sites. **J Biol Chem** 2003; 278:48770-8.
- 127 Wang XQ, Sun P, Paller AS. Ganglioside GM3 inhibits matrix metalloproteinase-9 activation and disrupts its association with integrin. **J Biol Chem** 2003; 278:25591-9.
- 128 Weiss M, Hettmer S, Smith P, Ladisch S. Inhibition of melanoma tumor growth by a novel inhibitor of glucosylceramide synthase. **Cancer Res** 2003; 63:3654-8.
- 129 Whiteman DC, Parsons PG, Green AC. p53 expression and risk factors for cutaneous melanoma: a case-control study. *Int J Cancer* 1998;77:843-8.
- 130 Yamamura S, Handa K, Hakomori S. A close association of GM3 with c-Src and rho in GM3-enriched microdomains at the B16 melanoma cell surface membrane: a preliminary note. **Biochem Biophys Res Comm** 1997; 236:218-22.
- 131 Yoshida S, Fukumoto S, Kawaguchi H, Sato S, Ueda R, Furukawa K. Ganglioside G(D2) in small cell lung cancer cell lines: enhancement of cell proliferation and mediation of apoptosis **Cancer Res** 2001;61:4244-52
- 132 Yoshida S, Kawaguchi H, Sato S, Ueda R, Furukawa K. An anti-GD2 monoclonal antibody enhances apoptotic effects of anti-cancer drugs against small cell lung cancer cells via JNK (c-Jun terminal kinase) activation. **Jpn J Cancer Res** 2002;93:816-24.
- 133 Zeng G, Gao L, Birkle S, Yu RK. Suppression of ganglioside GD3 expression in a rat F-11 tumor cell line reduces tumor growth

angiogenesis and vascular endothelial growth factor production
Cancer Res 2000; 60:6670-6.

- 134 Zeng G, Gao L, Yu RK. Reduced cell migration tumor growth and experimental metastasis of rat F-11 cells whose expression of GD3-synthase is suppressed. **Int J Cancer** 2000; 88:53-7.
- 135 Zeng G, Li DD, Gao L, et al. Alteration of ganglioside composition by stable transfection with antisense vectors against GD3-synthase gene expression. **Biochemistry** 1999; 38:8762-9.
- 136 Zhu N, Lalla R, Eves P, et al. Melanoma cell migration is upregulated by tumour necrosis factor-alpha and suppressed by alpha-melanocyte-stimulating hormone. **Br J Cancer** 2004; 90:1457-63.

A

P1=rrrrccwwgyyyy [3,0,0] p2=0... 13 p3=rrrrccwwgyyyy [3,0,0]
 P=40... 13 p5=rrrrccwwgyyyy [3,0,0] p6=-... 13 p7=rrrrccwwgyyyy [3,0,0]
 Length (p2+p4+p6) <20
 p1/p3/p5/p7: (p8=nnnncnngnnnnnnncnngnnnnnnncnngnnnnnnncnngnnnn)
 p1/p3/p5/p7: (p8=rrrrccwwgyyyyrrrrccwwgyyyy [3,0,0])
<http://bighost.ba.itb.cnr.it/BIG/PatSearch/>

B

```
>gi|42476102|ref|NM_008080.3| Mus musculus UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:(N-acetylneuraminy)-galactosylg
CCTGGGAGCGCGACGCGGTGCCAGGGCTTCCCGCTTTGTCGCTGGGGCTGGGGCGCGGGCGGATTTACGA
TCCAGTTCACCCCGGCAGGAAACGTTTCAGAACCACCCCGCGCTGCGGTCTACAAAGCCCCGGAGTCCGC
AGGCGGGAGGAGTCGGATCCCCGACACTGTCGGGCTCCCTCCCGCCAGCTCCCGCATCAGGCCGTGCC
GGCCTCATGAGGACCCCGGCCGGGGCGGAGAACCGGGCACTGCCCGGACCCGCGATCCTGCCCGGGCT
TAGAACGTTAGACAGGATGCGGCTAGACCGCGGGCCCTCTATGCGCTAGTCTTGCTGCTCGCCTGCGCC
TCGCTGGGTCTCTGTACTCCAGCACCCGAAACGCGCCAAGTCTCCCGAACCTCTGGCATTGTGGTTCGC
CCCCACAAGGTCCCCCGAGACTCGATCTGCTAGACCTTGCCCTGAGCCTCGCTACGCACACATCCCCGGT
CAGGATCAAGGAGCAAGTGGTGGGGCTGCTGGCTCAGAACAACAGTGTGAATCCAAGGGAGGAAGC
CTTCCCTTGCCTTTCTGAGACAGGTTCCGGCGGTTGACCTCACTAAAGCCTTTGACGCTGAGGAGCTGA
GGGCTGTTTCTGTCGCCAGGGAGCAGGAATACCAGGCCTTCTTGAAGGAGCCGGTCCCTGGCTGACCA
GCTGCTGATAGTCCCCGCAACTCCCCCTTACAGTACCCCTGCAGGGTGTGGAGGTTACAGCCCTCAGG
AGCATCTGGTACCAGGGTAAGTCTGCAGGAAGCTTCTGTCAGGAGATATACCAGGTGAACCTGAGTG
CTTCTCTAGGCACCTGGGATGTGGCAGGGGAAGTAACAGGAGTACTCTCACGGGAGAGGGGCAACCGGA
TCTCACCTTGGCAGCCAGTCTTGATAAACTCAACCGGCAGCTGCAACTGGTGAATACAGCAGCCGG
AGCTACCAGGCAACACAGCAGACACAGTCCGGTCTCCACCAAGGACATGAAGTTGCCCTTACCATCC
TCGTAAGACACCTCCCAACCCCGGGTGTACCCACCATCATCCCTACCCCAAGGAGCCGAGTACAACAT
CAGTGTCTGGTTACCATTGCCACCAAGACTTTTCTTCTGTTATGATCGACTACGGACACTCATTGCCAGC
ATCCGACGCTTTTACCCTACGGTCAACATAGTCAATCGCTGACGACAGTGACAAACCGGAGCGCATTAGCG
ACCCACACGTGGAGCACTACTTTCATGCCCTTCCGGCAAGGGTGGTTCGCAAGGTCGGAACCTGGCGGTGC
CCAAGTAACCACCAAAATACGTGCTGTGGTGGACGACGACTTTGTTTACGGCGCGCACGCGGCTGGAG
AAGCTTGTGGACGTGCTCGAGAAGACGCCCTGGACCTGGTAGGGGGCGCGGTGCGGGAGATCTCGGGCT
ACGTAACCACCTACCGGCAGTGTGAGTGTGGAGCCGGGGCGCCCAAGGCCTTGGGAAGTCTTCCGGCA
AAAGCAGGGCTTCCACACGAGCTCGTTGGCTTCCCAAGTTGTGTGGTACAGACGGCGTGGTCAACTTT
TTCCTGGCGCGCACAGACAAAGTGCGCCAAGTGGGCTTTGACCCACGCCTCAACCGGGTGGCACATCTGG
AATTCTTCTGGATGGACTTGGTTTCTTCTGTTGGCTCTGCTCTGATGTTGTTGTTGGATCATGCATC
GAAGGTGAAGCTGCCGTGGACAGCAAAGGACCCAGGAGCTGAAACTTATGCCCGTTACCGGTACCCGGGA
TCACTGGACCAAAGTCAAGTGGCCAAACATCGCCTACTTCTTCAAACACCGGCTACAGTGCATGACCG
CCGAGTGACGTCTGATTTGGGCTTACACTGTCAGGCTGGGCTGCCTCCTTGTTCCTTCCAGGATTAT
CCACCACCTCCATCCCTGTGCACCCCACTGATGAACACCCTGGCTTCCCGATCCTTCCACCAATCT
GATTCCTAACAGGGGCTTGTCTGTTGACACCCTTCTTCTGTGAGCGACCAGAGGCCCGATGGAGCCA
TATCCTTCCCCCACAGCCAGTGCCAAGTCTCCACAACCCCATCCTATGGGGCAGGAAATGGGGA
GGTTCATTTCCAAGTGCCAAAGAGCCCAAGGACTTAAGACCCTCAAGTGGAACACTCTCACCTCC
CGAGGTGGGCAGGGAAACTCCCAATTTGCAACCCCAAGGACATGCACCCACCCAGCTCTGGATCCAGC
ACCGTGTGTACCGGCTCCACATACCCCAACAGAAAGCACTGTGACTGTAGTCTGTGGGGCTGGTGAACA
CACGGTGAAAGCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
```

Anexo 1: Elemento responsivo ao fator de transcrição p53 identificado no gene da G_{M2}/G_{D2} sintase. (A) A fórmula usada para identificar o elemento responsivo a *TP53* (PatSearch)³⁹ que incluem dois passos de pós processamento e restrição quanto ao tamanho dos intervalos entre os decâmeros; (B) Sequência do mRNA de *G_{M2}/G_{D2} sintase* em formato “FASTA” (NM_008080.3 código de entrada do gene no “site” do NCBI). Em azul está marcado o códon de iniciação de tradução da proteína e em vermelho o elemento responsivo a *TP53* identificado em *G_{M2}/G_{D2} sintase*.